

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PRENATAL TANI AMACIYLA BAŞVURAN GEBELERDE
DOWN SENDROMLU BEBEK SAHİBİ OLMA VE
MATERNAL METİLENTETRAHİDROFOLAT
REDÜKTAZ GENOTİP İLİŞKİSİ**

Nurşen KESER

**TIBBİ BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI**

ADANA-2016

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PRENATAL TANI AMACIYLA BAŞVURAN GEBELERDE
DOWN SENDROMLU BEBEK SAHİBİ OLMA VE
MATERNAL METİLENTETRAHİDROFOLAT
REDÜKTAZ GENOTİP İLİŞKİSİ**

Nurşen KESER

**TIBBİ BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI**

Bu Tez Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Tarafından TF2013YL6 No' lu Proje ile Desteklenmiştir.

ADANA-2016

KABUL ve ONAY

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

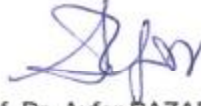
Tezli Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan

**“Prenatal Tanı Amacıyla Başvuran Gebelerde Down Sendromlu Bebek Sahibi Olma ve
Meternal MTHFR Genotip İlişkisi”**

adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 24 / 06 / 2016

TEZ SINAV JÜRİSİ



Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI
Çukurova Üniversitesi
Danışman



Prof. Dr. Ümit LÜLEYAP
Çukurova Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL
Mersin Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve
edilmiştir.

sayılı kararı ile kabul

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI
ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 23/06./2016



Nurşen KESER

Kayıtlı olunan Program : Tıbbi Biyoloji
Tezin Konusu : Prenatal Tanı Amacıyla Başvuran Gebelerde Down Sendromlu
Bebek Sahibi Olma ve Maternal MTHFR Genotip İlişkisi

Tezin Türü : Yüksek Lisans : ☒ Doktora: ☐

Danışmanın Adı-Soyadı : Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI

Danışmanın İletişim Bilgileri

Telefon : 0322-3386060-3498

E-Posta : payfer@cu.edu.tr

Öğrencinin İletişim Bilgileri

Telefon : 05437421857

E-Posta : bionursen@gmail.com

Adresi : Yüzüncüyıl Mah. 85510
sk. No:8 Çukurova
Konakları E Adası D:10
Çukurova ADANA

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca emeğini, desteğini ve yardımını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI' na en içten dileklerle teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimime değerli katkıları olan başta, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. H. Ümit LÜLEYAP olmak üzere, Anabilim Dalımız Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. Halil KASAP'a, Sayın Prof. Dr. Osman DEMİRHAN'a, Sayın Prof. Dr. Davut ALPTEKİN'e, Sayın Doç. Dr. M. Bertan YILMAZ'a ve Anabilim Dalımız Emekli Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Mülkiye KASAP'a teşekkür ederim.

Yardımlarından dolayı Uzman Dr. Sabriye KOCATÜRK SEL'e, Uzman Dr. Erdal TUNÇ'a ve Uzman Dr. Nilgün TANRIVERDİ' ye teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ve bana destek olan Araştırma Görevlisi Lütfiye ÖZPAK'a, Araştırma Görevlisi Nermin Seda ILGAZ'a ve Araştırma Görevlisi Gamze CÖMERTPAY'a teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimime idari destek sağlayan Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Hacıali İşletmesi Koordinatörü Veteriner Hekim Uğur KARA'ya teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TF2013YL6 nolu proje ile desteklenmiştir.

Sevgili annem, babam ve kardeşlerime eğitim hayatıma yapmış oldukları katkı ve desteklerden dolayı teşekkür ederim. Yüksek Lisans eğitimim süresince maddi ve manevi desteğini esirgemeyen eşim Mustafa Besim KESER'e göstermiş olduğu sabır ve anlayışından dolayı teşekkür ederim. Hayatımda önemli ve değerli bir yeri olan Doç. Dr. Gonca KESER'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	i
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	4
2.1. Down Sendromu	4
2.2. Down Sendromu Etiyolojisi	7
2.3. Down Sendromu Biyolojik Yaş Hipotezi	7
2.4. Mayotik Rekombinasyon ve Maternal Yaş Etkisi	8
2.5. Down Sendromu Türleri	8
2.5.1. Trizomi 21	8
2.5.2. Robertsonian Translokasyonu	8
2.5.3. Resiprokal Translokasyon	9
2.5.4. Mozaisizm	9
2.6. Folat Eksikliğinin Etkisi	9
2.7. Folat Metabolizması	11
2.7.1. Plasmada Folat	11
2.7.2. Eritrositlerde Folat	12
2.7.3. Hücresel Transport	12
2.8. Tek Karbon Transfer Reaksiyonlarında Folat Koenzimleri	12
2.8.1. Histidin Katabolizması	13
2.8.2. Pürin ve Pirimidin Nükleotid Sentezi	13
2.8.3. Serin ve Glisin Dönüşümü	13
2.8.4. Homosistein Remetilasyon Döngüsü	14
2.8.5. Folat ve Embriyonik Gelişim	15

2.8.6. Folat Yetersizliğinin Teratojenik Etkisi.....	16
2.9. Homosistein Metabolizması	16
2.9.1. Homosistein ve Embriyonik Gelişim.....	17
2.10. MTHFR Aktivitesi.....	18
2.11. MTHFR Yapısı ve Fonksiyonu.....	21
2.12. MTHFR Polimorfizmleri	22
2.13. MTHFR Polimorfizmlerinin Bazı Hastalıklarla İlişkisi	23
2.14. MTHFR-Çevre etkileşimleri.....	25
2.15. MTHFR –Diğer gen etkileşimleri.....	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1 Araç ve Gereçler	27
3.1.1. Kimyasal Malzemeler	27
3.1.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler.....	27
3.2. Kan Örneklerinin Sağlanması.....	28
3.2.1. Hasta Rızası	28
3.3. Yöntem.....	29
3.3.1. Homosistein ve Folat Ölçümü	29
3.3.2. Periferik Kandan DNA Eldesi	29
3.3.3. DNA Konsantrasyonun ve Saflık Derecesinin Ölçülmesi	30
3.3.4. Agaroze Jelin Hazırlanması.....	31
3.3.5. Örneklerin Agaroze Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi	31
3.3.6. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yönteminin Uygulanması	32
3.3.6.1. MTHFR Geni A1298C Polimorfizmi için PZR Yönteminin Uygulanması	33
3.3.6.2. MTHFR Geni C677T Polimorfizmi için PZR Yönteminin Uygulanması	34
3.3.7. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP Restriction Length Fragment Polymorphism) Yönteminin Uygulanması.....	36
3.3.8. İstatistiksel Analiz	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. Biyokimyasal Bulgular	39
4.2. Moleküler Bulgular	41

4.2.1. MTHFR Geni 1298 A>C Polimorfizmi İçin Moleküler Genetik Bulgular	41
4.2.2. MTHFR Geni 677 C>T Polimorfizmi İçin Moleküler Genetik Bulgular..	44
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	55
KAYNAKLAR	57
EKLER	64
EK-1. DNA Eldesi Solüsyonları	64
EK-2. Elektroforez Analiz Solüsyonları	66
ÖZGEÇMİŞ	67



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	GTG bantlama ile Standart Down Sendromu Karyotipi (30).....	5
Şekil 2.	21. kromozomun yapı ve morfolojisi. ISCN' ye göre ideogram(25)	6
Şekil 3.	Folat Döngüsü (77).....	19
Şekil 4.	Tek karbon ve transsülfürasyon Metabolizması: Bazı çalışmalarda Down sendromlu çocuk doğma insidansını etkilediği belirtilen enzimler koyu ve sarı renkte gösterilmiştir. Kırmızı renkte olan enzimler, 21. kromozomda kodlanan genlerdir. Yeşil renkte gösterilen bileşenler hücre yaşamı, replikasyon ve fonksiyonunda kritik role sahip olan metilasyon reaksiyonlarının ürünleridir. Soru işareti (?) ile gösterilenler o reaksiyonda önemi net olarak bilinmeyenlerdir. Kısaltmalar; MTHFR: Metilen tetrahidrofolat redüktaz; MTR: Metiyonin sentaz; MTRR: Metiyonin sentaz redüktaz; FH ₂ : Dihidrofolat; FH ₄ : Tetrahidrofolat; glun: Poliglutamatlar; TMP: Timidin monofosfat; dUMP: deoksiuridin monofosfat; figlu: formiminoglutamat; GAR: Fosforibozilglisinamid; FGAR: Fosforibozilformilglisinamid; AICAR: Fosforibozilamino imidazol karboksamid; FAICAR: Fosforibozilformilamino imidazol karboksamid; NAMT1: putatif N6-DNA metil transferaz; RFC: İndirgenmiş folat taşıyıcısı; GART: Fosforibozilglisinamidtransformilaz; PRMT2: Protein arjinin N-metil transferaz 3-like; CBS: Sistation beta sentaz; FTCD: Formimino tetrahidrofolatsiklodeaminaz (19).	21
Şekil 5.	MTHFR geni 1298 A>C polimorfizmi için PZR ile çoğaltılan 138 baz çiftlik bölge.....	33
Şekil 6.	MTHFR geni 677 C>T polimorfizmi için PZR ile çoğaltılan 198 baz çiftlik bölge.	35
Şekil 7.	Hasta gruba ait bazı örneklerin, MTHFR geni ekzon 7 bölgesinde ki 138 bç. uzunluğunda ki bölgenin PZR yöntemi ile çoğaltılıp agaroz jelde yürütüldükten sonra oluşturdukları bant görüntüleri. M: Markır DNA, Bantlar 138 bp. büyüklüğündedir.....	41
Şekil 8.	Hasta gruba ait bazı örneklerin, MTHFR geni 677 bölgesini içeren 198 baz çifti uzunluğundaki bölgenin PZR yöntemi ile çoğaltılıp agaroz jelde yürütüldükten sonra oluşturdukları bant görüntüleri. M: Markır DNA.	45
Şekil 9.	Hasta ve kontrol gruplarına ait bazı örneklerin RFLP yöntemi ile (Hinf I enzimi ile) kesilip, agaroz jelde yürütüldükten sonra oluşturdukları bant görüntüleri. M: Markır DNA, CC, CT, TT: genotipler.	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.	MTHFR geni 1298 polimorfizmi için ekzon 7 bölgesinin amplifikasyonu için gerekli primer çiftleri.....	33
Çizelge 2.	MTHFR geni ekzon 7 bölgesinin optimal amplifikasyonlarının gerçekleşmesinde kullanılan maddeler ve miktarları.....	34
Çizelge 3.	MTHFR geni ekzon 7 bölgesinin optimal amplifikasyonlarının gerçekleştiği PZR programı ısı döngüleri	34
Çizelge 4.	MTHFR geni 677 polimorfizmi için ekzon 4 bölgesinin amplifikasyonu için gerekli primer çiftleri.....	35
Çizelge 5.	MTHFR geni 677 C>T polimorfizmi için optimal amplifikasyonlarının gerçekleşmesinde kullanılan PCR reaksiyon koşulları.	36
Çizelge 6.	MTHFR geni 677 C>T polimorfizmi için optimal amplifikasyonlarının gerçekleştiği PZR programı ısı döngüleri.	36
Çizelge 7.	MTHFR geni 1298 ve 677 polimorfizmleri için RFLP reaksiyon koşulları.	37
Çizelge 8.	MTHFR geni 1298 ve 677 polimorfizmleri için RFLP reaksiyonu ısı döngüleri.....	37
Çizelge 9.	Down sendromlu çocuk sahibi annelerin ve sağlıklı çocuk sahibi annelerin homosistein ve folat değerlerinin ortalama, standart hata ve p değerleri.....	40
Çizelge 10.	Down Sendromlu çocuğu olan annelerden oluşan hasta grubu ve sağlıklı çocuğu olan kontrol grubu annelerin MTHFR geni 1298 bölgesi için FnU4HI enzimi ile kesimi sonucunda elde edilen genotip kodları.....	42
Çizelge 11.	MTHFR geni 1298 bölgesi için down sendromlu çocuk sahibi annelerden oluşan hasta ve sağlıklı çocuk sahibi annelerden oluşan kontrol gruplarına ait genotip frekansları (n: birey sayısı).....	43
Çizelge 12.	MTHFR geni 1298 bölgesi için down sendromlu çocuk sahibi annelerden oluşan hasta ve sağlıklı çocuk sahibi annelerden oluşan kontrol gruplarına ait allel frekansları (n: birey sayısı).....	44
Çizelge 13.	Down Sendromlu çocuğu olan annelerden oluşan hasta grubu ve sağlıklı çocuğu olan kontrol grubu annelerin MTHFR geni 677 bölgesi için Hinf I enzimi ile kesimi sonucunda elde edilen genotip kodları	47
Çizelge 14.	MTHFR geni 677 bölgesi için down sendromlu çocuk sahibi annelerden oluşan hasta ve sağlıklı çocuk sahibi annelerden oluşan kontrol gruplarına ait genotip frekansları (n: birey sayısı).....	48
Çizelge 15.	MTHFR geni 677 bölgesi için down sendromlu çocuk sahibi annelerden oluşan hasta ve sağlıklı çocuk sahibi annelerden oluşan kontrol gruplarına ait allel frekansları (n: birey sayısı).....	49

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat Derece
CpG	: Sitozin-fosfat-Guanin
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
Dntp	: Deoksi Nükleotit Tri Fosfat
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EtBr	: Etidiyum Bromür
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
nmol	: Nanomol
mL	: Mililitre
M	: Markır
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
MTHFR	: Metilentetrahidrofolat Redüktaz
M	: Molar
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
SAM	: S-Adenosil Metiyonin
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizm
TE	: Tris EDTA
TEMED	: Tetrametilendiamin
THF	: Tetrahidrofolat
MI	: Mayoz I
MII	: Mayoz II
A	: Adenin
C	: Sitozin
T	: Timin
DS	: Down Sendromu
C terminal	: Karboksi Terminal

FAD : Flavin Adenin Dinükleotid
UV : Ultraviyole



ÖZET

Prenatal Tanı Amacıyla Başvuran Gebelerde Down Sendromlu Bebek Sahibi Olma ve Maternal Metilentetrahidrofolat Redüktaz Genotip İlişkisi

Down sendromu ya da trisomi 21, 21. kromozomda yer alan genlerin 3 kopyasının ekspresyonuna bağlı en sık görülen genetik hastalıktır. Bu durum, olguların yaklaşık %90'ında mayoz süresince maternal kromozom ayrılamamasından kaynaklanmaktadır. Kromozomal ayrılamama ve folat metabolizması arasındaki ilişki son yıllarda ilgi çekmeye başlamıştır. Folat, bölünme ve diğer aşamalarda epigenetik düzenleyici olan hücrel metilasyon reaksiyonlarındaki görevinden dolayı, hücre bölünmesi boyunca genetik materyal dağılımında önemli role sahiptir. MTHFR (Metilentetrahidrofolat redüktaz); 5,10-metilentetrahidrofolat'ı, homosisteinin metionine remetilasyonu için metil vericisi olan 5-metiltetrahidrofolat'a dönüşümünü katalizlemektedir. MTHFR, DNA sentezi ve metilasyon reaksiyonları gibi önemli yollarda etkilidir. MTHFR geninde meydana gelen en yaygın polimorfizmler C677T (rs1801133) ve A1298C (rs1801131)' dir.

Bu çalışmanın amacı Down Sendromlu çocuk sahibi olma durumu ile maternal MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi araştırmaktır. Ayrıca hasta ve kontrol gruplarında serum homosistein ve folat düzeyleri de tespit edilmiştir. C677T polimorfizmi için genotip ve allel frekansları bakımından hasta ve kontrol grubu arasında istatistiki olarak önemli bir fark saptanmıştır ($p<0.05$). Hasta grubunda normal genotipe sahip bireylerin oranı %9 iken kontrol grubunda %42.4 olarak gözlenmiştir. Homozigot bireylerin oranları ise birbirine benzer olarak tespit edilmiştir (%16.4-%16.7). Hasta grubunda T alleli frekansına ait oran (%53.7) yüksek iken kontrol grubunda C alleli frekansına ait oran (%62.9) yüksek bulunmuştur. Diğer taraftan A1298C polimorfizmi için hasta ve kontrol grupları arasında genotip ve allel frekansları bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Serum folat ve homosistein düzeyleri karşılaştırıldığında hasta ve kontrol grubunda istatistiki olarak önemli bir fark olduğu gözlenmiştir. Serum folat (ng/mL) ve homosistein (nmol/mL) değerleri ortalaması hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla 6.05;7.85 / 13.46;18.14 bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: Down sendromu, folik asit, homosistein,MTHFR, polimorfizm,

ABSTRACT

The Applicant for the Purpose of Having a Baby with Down's Syndrome in Pregnant Women Prenatal Diagnosis and Relationship Between Maternal Methylenetetrahydrofolate Reductase Genotype

Down Syndrome or Trisomi 21 is the most common genetic disease related with expression of 3 copies located on 21. chromosome genes. This situation, about 90% of cases, originate from maternal chromosome nondisjunction during meiosis. In recent years, the relation between chromosome nondisjunction and folate metabolism has begun to draw attention. Folate has an important function the distribution of genetic material during segmentation because of its function, which is epigenetic regulatory in segmentation and other stages, in cellular methylation reactions. MTHFR (Methylenetetrahydrofolate Reductase); catalyzes the transformation of 5,10- Methylenetetrahydrofolate to 5-Methyltetrahydrofolate, which is a methyl transmitter, for remethylation of homocysteine to methionine. MTHFR is effective in important pathways as DNA synthesis and methylation reactions. The most common polymorphisms occurring in MTHFR gene are C677T (1801133) ve A1298C (1801131).

The objective of this study is to explore the relation between the condition of having children with Down Syndrome and maternal MTHFR C677T and A1298C polymorphisms. Besides, homocysteine and folate levels were also determined in case and control groups. A statistically significant difference was determined between case and control groups in terms of genotype and allele frequencies for C677T polymorphism ($p < 0.05$). While the rate of individuals with normal genotype was 9% in case group, it was observed 42.4% in control group. The rate of homozygous individuals were determined similar (%16.4-%16.7). While the rate of T allele frequency (%53.7) was great in case group, the rate of C allele frequency (%62.9) was determined great in control group. On the other hand, no significant difference was observed in terms of genotype and allele frequencies between in case and control groups for A1298C polymorphism ($p > 0.05$). When serum folate and homocysteine levels were compared, a significant difference was observed statistically in case and control groups. The average level of serum folate (ng/mL) and homocysteine (nmol/mL) were observed within the case and control groups 6.05; 7.85/ 13.46;18.14, respectively.

Key words: Down syndrome, folic acid, homocysteine, MTHFR, polymorphism.

1. GİRİŞ

Down Sendromu (DS), canlı doğan bebeklerde en sık görülen otozomal kromozom bozukluğudur. Çocukların, bir yaşından fazla yaşayabildiği tek otozomal trizomidir. İlk kez 1866’ da Langdan Down tarafından bildirilmiştir. Hastalığın temel nedeni kromozom 21’ in mayoz sırasındaki ayrılamama durumudur. Hastaların %95’ i klasik trizomi, %1’i mozaik ve %4’ü translokasyon tipi karyotip göstermektedir. En sık rastlanan translokasyon t(14q21q) ve t(21p22p)’ dir. Canlı doğumlar arasındaki sıklığı 1/700 civarındadır. Görülme sıklığı anne yaşındaki artışa bağlı olarak artmaktadır (1).

Kadınlarda primordial oositler fetal gelişim boyunca Mayoz I’e dahil olurlar, DNA replikasyonu devam eder ve sonra ovulasyona kadar profaz I’ de kalırlar. Mayoz II fertilizasyondan sonra tamamlanmaktadır. Gebelikte ileri maternal yaş ve 21. kromozom rekombinasyonunda bozukluk kromozom 21’ in ayrılamamasında en iyi bilinen iki maternal risk faktörüdür (2,3). Özellikle Mayoz I’deki hatalar rekombinasyonun olmaması ile ilişkilendirilmekte ve bu ilişkiler oosit yaşından bağımsız olarak görülmektedir (2,4,5). Bunun tersine Mayoz II hataları, artan oosit yaşına bağlı olarak görülen 21q sentromeri yakınında meydana gelen rekombinasyon ile ilişkilendirilmektedir. Bu bölge bir spesifik kromozom bölgesinin rekombinasyona girmesini etkileyen, GC içeriği ve CpG adacığы içeren genomik özellikler olarak ifade edilmektedir. MI ve MII hatalı oositlerin küçük bir bölümünde yer değiştirmiştir, bu rekombinant yapılar kromatin yapısı ya da epigenetik modifikasyonlar gibi perisentromerik DNA’ nın karakteristik özelliklerini gösteren proksimal bölgelerde meydana gelen olaylardır (6,7).

20.000’ den fazla oositte yapılan bir araştırmada birçok trizomi 21 olgusunun MI ve MII hataları ya da MI kaynaklı hatalardan meydana geldiğini göstermiştir ve bunlar maternal büyükannede annenin fetal gelişimi sırasında başlamış ya da oluşmuş rekombinasyon hataları ile ilişkili olabilmektedir. Olguların %35’ inde fazlası yetişkinlikte meydana gelen maternal MII hatalarından kaynaklı olmaktadır (7,8).

Başlangıçta DS’ li doğum için ileri maternal yaş risk olarak belirlenmiştir ve kromozomal ayrılamama mekanizmasıyla ilişkili bazı durumlarda DS’li doğum oranında ileri anne yaşına bağlı artış doğrulanmıştır (9,10). Fakat bu etki oositlerde meydana gelen ayrılamama ile sınırlandırılmıştır (7,11,12,13,14). Bunun dışında

spermatogenezde ayrılamama, post zigotik mitotik hata ve translokasyon da DS oluşumunda etkili olan mekanizmalardır. Bazı çalışmalarda bir DS' li fetuse gebelik döneminde annelerin ortalama yaşı normal bebeğe sahip annelere göre oldukça yüksek bulunmuştur. Yapılmış olan başka bir çalışmada trizomi 21' in MI ve MII hataları arasındaki farklılıkları ortaya koymuştur. MII hataları için artan risk MI hataları ile karşılaştırıldığında ilerlemiş anne yaşına göre değiştiği görülmüştür. MII de hata olan kadınların ortalama yaşı MI' de hata olan kadınlardan daha büyüktür (7,15).

Tek karbon metabolizması, birçok biyolojik fonksiyonlarda kullanılmak üzere çevreden besinleri kullanan metabolik bir ağdır. Folat ve metiyonin döngüleri, histon ve DNA metilasyonunu içeren metilasyon reaksiyonları için metil vericisi olan S-adenosilmetionin' i (SAM) oluşturmaktadır. Histon metilasyonu epigenetik kodun kritik bir parçasıdır ve gen ekspresyonunun regülasyonuna aracılık eden kromatin yapısının oluşumunda rol oynamaktadır. Histon metil transferazın aktivitesi, hücre metabolizması ve histon metilasyonu ile ilişkiyi destekleyen hücresel besin kullanılabilirliği kararsız olan intraselüler SAM miktarına bağlıdır (16).

Tek karbon metabolizması metabolik yollarda kullanılmak üzere glukoz, vitamin ve aminoasit gibi besinlere ihtiyaç duymaktadır. Bu yollar nükleotid metabolizması, lipid biyosentezi ve metilasyon metabolizması gibi yolları içermektedir. Tek karbon metabolizmasının iki ana bileşeni folat ve metionin döngüsüdür (16,17).

Folik asit DNA ve protein sentezinde gerekli bir vitamindir. Pteridin, p-aminobenzoik asit ve glutamik asitten oluşmaktadır. Folik asit ve türevleri, pürin ve pirimidin bazlarının biyosentezi, glisin, serin, homosistein ve metiyonin aminoasitlerinin metabolizması gibi önemli biyokimyasal olaylarda rol almaktadır (18).

Folat yetersizliği, büyüme geriliği, anemi, kilo kaybı, sindirim hastalıkları ve bazı davranış sorunları ile ilişkilendirilmektedir. Düşük folat değerleri ayrıca nöral tüp defekti için risk faktörü olarak görülmekte ve gebelik öncesi ve sonrasında folik asit kullanımı önerilmektedir (19).

Folat metabolizmasında birçok gen yer almaktadır. 1999 yılında Jill James ve arkadaşları bu genlerden biri olan MTHFR (metilentetrahidrofolat redüktaz)' ın down sendromlu çocuk sahibi olma durumu için maternal risk faktörü olabileceğini ve annelerde plasma homosistein seviyelerinin arttığını bildirmişlerdir. MTHFR C677T

polimorfizminin enzim aktivitesinde azalmaya neden olduğu bilinmektedir (19,20,21,22). Azalan enzim aktivitesinin kromozomun perisentromerik bölgesinde DNA hipometilasyonundan sonuçlanacağı öne sürölmektedir. Hipometilasyon trisomi 21 için yatkınlık kazandıran anormal kromozom dağılımına sebep olabilmektedir (23).

Bu tez çalışmasında down sendromlu bebek sahibi olma ile maternal MTHFR (gen ID:4524) geni arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada down sendromlu çocuğu olan annelerden ve sağlıklı çocuğa sahip olan annelerden alınan kanlar DNA izolasyonu için, kan serumlarında folat ve homosistein düzeylerinin belirlenmesi için değerlendirilmiştir. MTHFR geni C677T (rs1801133) ve A1298C (rs1801131) polimorfizmleri PCR-RFLP yöntemi ile analiz edilmiştir. Çukurova bölgesinde down sendromlu bebeğe sahip olma ile maternal MTHFR polimorfizmleri arasındaki ilişki ortaya çıkarılmış, genotip ve allel frekansları ile folat-homosistein değerleri gözönünde bulundurularak değerlendirmeler yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Down Sendromu

İnsan uluslararası kromozom adlandırma sisteminde (ISCN) insan kromozomlarının sayısı $2n=46$ ' dir ve ikiye ayrılmaktadır (24). Bunlardan ikisi seks kromozomları ya da gonozomlar (X,Y) ve 44 otozomlardır. Otozomlar azalan boylarına göre 1'den 22 ye kadar numaralandırılmaktadır.

İkinci en küçük kromozom olan 21. kromozom Down Sendromu (DS) karyotipinde 3 tane tespit edilmiştir (Şekil 1). Daha sonraki çalışmalar DS' nin en küçük kromozom trizomisi olduğunu göstermiştir.

Kromozom 21' in uzunluğu, insan genomunun toplam uzunluğu' nun $\%1.9\pm0.17$ ' udur ve yaklaşık olarak 60 Mb' dir. Kromozom 21 akrosentrik kromozomlardanır. Kısa kolu (21p) heterokromatiktir fakat tekrarlı DNA' nın farklı yapılarından oluşmaktadır (25).

Kısa kolun uzunluğu toplam uzunluğun yaklaşık $\%30$ ' u kadardır. p13 bandının $\%10$ ' u ve p11.2 bandının $\%2$ ' sinde farklılıklar tanımlanmıştır. p12' de $\%0.7-1.3$ ve p13' ün satellitlerinde $\%0.1$ oranında duplikasyonlar görülür. Bu üç bölgedeki delesyonlar nadirdir (26). Kromozom 21'in kısa kolu en uzak telomer ve perisentromerik bölge q11.1 haricinde ökromatiktir.

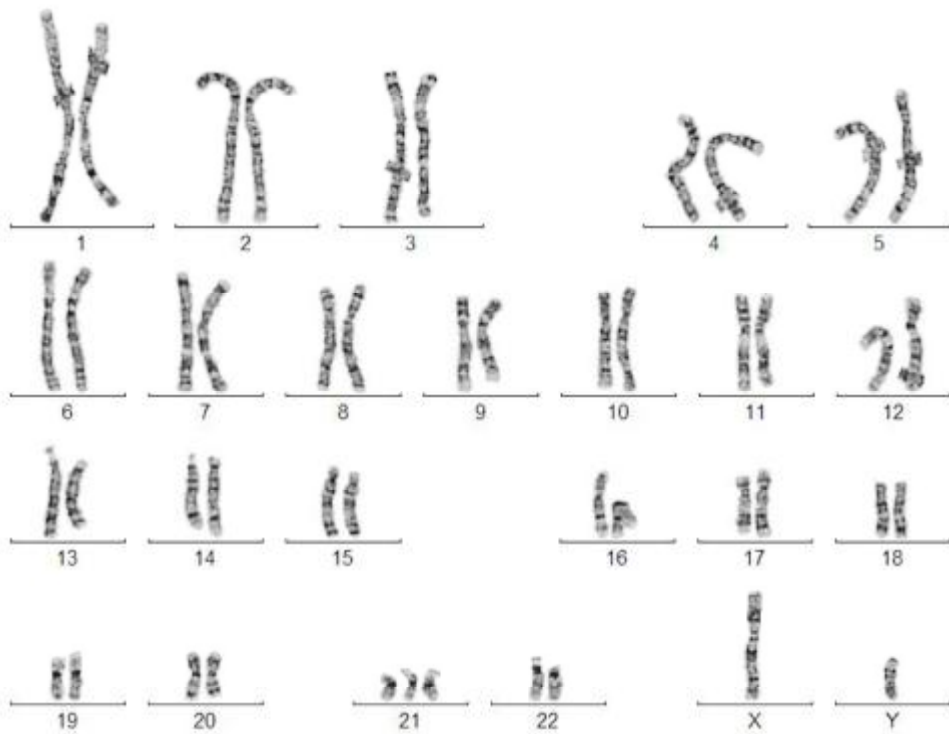
Kromozom 21' in sentromerinin merkezi parçası 13. kromozomun sentromeri ile identik olan α -satellit DNA' dan oluşmaktadır. α -satellit DNA' nın iki tarafı β -satellit DNA ile çevrilmiştir. Bu iki kodlamayan bölge duplikasyon yada delesyonlarla büyüklüklerinde önemli değişim gösterebilmektedir. Onların uzunluğu bölgenin ortalama uzunluğunun $\%20$ ' sinden daha az olmadıkça kinetokorların normal gelişimi korunmaktadır. Aksi durumda mitozun anafazında kromatidlerin tam ayrılmasında başarısızlıkla sonuçlanabilir (27,28).

β -satellit DNA' nın distali kısa kolda yer almaktadır (p11.2). Büyüklüğünde önemli değişimler göstermektedir. Bu nedenle polimorfik bölge olarak tanımlanmaktadır. NOR (nucleolus organizing region) olarak adlandırılan ve ribozomal RNA genlerini içeren p12 bandı ile kısa kolda izlenmektedir. Çok az yana genişleme ile karakterizedir (29). Kısa kolun sentromere uzak bölgeleri satellitlerdir (p13), telomer

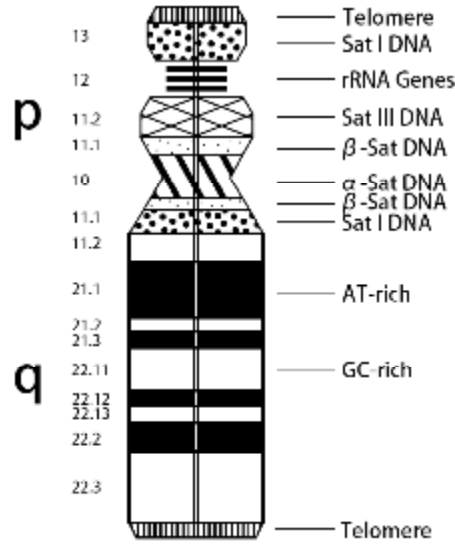
uçlarını içeren Sat I DNA'dan oluşmaktadır. Satelitler boyutu değişen polimorfik bölgelerdir. Duplike olabılme yeteneğine sahiptir.

Literatüre göre, 21. Kromozomun uzun kolunun (q11.1) proksimal (sentromere yakın) heterokromatik bölgesi β -satellit DNA'dan oluşmaktadır. Uzun kolun ana bölümü ökromatiktir. AT ve GC zengin bantlar karakteristik sekanslara sahiptir ve bantlar boyama özellikleri ile ayırt edilebilmektedir (30)

Tam ya da kısmi anöploid kromozom, anormal genetik materyalin miktarı ve çeşidine bağlı ekspresyonu olan taşıyıcılarda patolojik fenotip ile ilişkilidir.



Şekil 1. GTG bantlama ile Standart Down Sendromu Karyotipi (30)



Şekil 2. 21. kromozomun yapı ve morfolojisi. ISCN' ye göre ideogram(25)

22. kromozomun tersine 21. kromozom fazla sayıda AT sekanslarından bölgelerden oluşmaktadır. GC-zengin bölgeler ya da housekeeping genler birçok hücre çeşidinde eksprese edilmektedirler. Çeşitli metabolik ve yapısal fonksiyonları taşıyan proteinlere öncülük etmektedirler. Tersine AT-zengin genler dokuya özgüdür ve metilasyonla diğer dokularda inaktif oluyorken belirli hücrelerde aktivedirler. Bu gen inaktivasyonu kondense kromozom yapısıyla aynı anda gerçekleşmektedir ve bu nedenle bu genlerin DNA' sı transkripsiyon faktörleri için ulaşılabilir değildir. AT-zengin DNA bölgeleri yüksek yoğunlukta boyama gösterir ve kromozom analizleriyle lokalize olabilmektedir.

Kromozom 21' in fazla AT-zengin bölgeleri nedeniyle, trizomi 21 yaşamla uyumlu ve olguların çoğunda sadece taşıyıcıların gelişimini yavaşlatmaya neden olur ve letalite için trisomi 22 gibi değildir.

Kromozom 21' in gen haritası başlangıçta farklı gen ürünlerinin analizleriyle. küçük yapısal bozuklukların analizleri birleştirilerek oluşturulmuştur. Kromozom 21, 2000 yılında dizilenmiştir (31) ve 225 gen tespit edilmiştir. Bu trizomi 21' deki nispeten hafif fenotipi açıklayabilmektedir.

İlerleyen yıllarda DS için kritik bölge yerini belirleyebilmek için 21q' da fazla sayıda küçük bölgeler analiz edilmiştir. Fakat beklenildiği gibi doğrudan genotip-fenotip korelasyonu ortaya çıkmamıştır. Kromozom 21' in gen ürünlerinin büyük bir

kısmı gen ürünlerini ve homolog olmayan kromozomlarda onların fonksiyonunu da etkilemektedir (30,32,33)

2.2. Down Sendromu Etyolojisi

DS en sık görülen canlı doğan anöploididir ve dünya çapında insan popülasyonunun bütün etnik grupları arasında mental retardasyonun ayırt edilebilir formudur. Bu doğum defektinin çoğunluğu 21. kromozomda ayrılamama, parental gametogenez’ de mayoz süresince kromozomların uygun biçimde ayrılmasında başarısızlıktan kaynaklanmaktadır (34). Diğer otozomal anöploidiler gibi DS’li doğumların yaklaşık %90’ı maternal oogenez’ de meydana gelen hatalardan kaynaklanmaktadır ve bunların büyük bir çoğunluğu I. Mayotik bölünmede meydana gelmektedir (35,36,37,38). DS’lu doğum için maternal risk faktörleri araştırıldığında ileri maternal yaş ve mayotik rekombinasyondaki hata oositte 21. kromozom ayrılamaması altında yatan mekanizma ile ilişkili öne çıkan iki güçlü bağlantı olarak tespit edilmiştir.

Hindistan’ da trisomi 21 üzerinde yürütülen benzer bir çalışmada DS’ li çocuğa sahip yaklaşık 400 ailede, %88 oranında maternal hata ve bununda büyük çoğunluğu (%77) MI’ de ayrılamamanın olduğu vakalardır. Post zigotik mitotik hata %2, paternal hatalar ise %10 olarak tespit edilmiştir (30).

2.3. Down Sendromu Biyolojik Yaş Hipotezi

İlk kez Brook ve arkadaşları tarafından ileri sürülmüştür. Bu hipotezin temel fikri mayotik hataların ve sonraki anöploidinin artış oranının kadınların kronolojik yaşıyla değil ovaryumun biyolojik yaşlanması ile ilişkili olduğudur. Burada iki farklı görüş ortaya çıkmaktadır. Birincisi yaşlı ovaryumda mayotik hatanın artmış oranıyla hormonal sinyallerin optimal seviyeleri ile ilişkilidir. Gelişimin farklı aşamalarında antral folikülün sayısı birkaç çalışmada gösterildiği gibi artan maternal yaşla azalmaktadır. Antral folikül sayısındaki bu düşüş, oosit havuzunda azalmayla birlikte anöploid gebeliğe yatkın kadınların ovaryumunda hormonal çevrede bir dengesizlik oluşturmaktadır. Yaşlı kadınlar arasında uygun antral foliküller sınırlandırılmıştır ve ovaryum ovulasyon için optimal ya da hatalı oositi seçmek zorunda olabilmektedir.

Biyolojik yaşlanma, oositte kromozom ayrılma sistemine dahil edilen ovaryum protein bileşenlerinin degradasyonu ile ilişkili yaşlanma olarak yorumlanabilmektedir.

Hücre döngüsü genlerini içeren çok sayıda transkript düzeyinin kadınlarda artan maternal yaşla azaldığı belirtilmiştir (30).

2.4. Mayotik Rekombinasyon ve Maternal Yaş Etkisi

Maternal yaş dışında maternal ayrılamama ile ilişkili olduğu belirlenen tek faktör, mayotik rekombinasyonun modelinde değişiklik olmasıdır. Bununla ilgili ilk kanıt Warren ve ark.(39) tarafından kromozom 21'in ayrılamaması ile ilişkili azalan rekombinasyon içindir. Kiazmata, rekombinasyon bölgesinde homolog kromozomlar arasında fiziksel bağlantılardır ve sentromer kohezyonu ve kardeş kromatidlerle birlikte MI' de tetrad ya da eşleşmiş homologları dengelemek için çalışmaktadırlar. Mayotik iş üzerinde kromozom oryantasyonu hazırlamaya ve zıt kutuplara doğru ayrışmasını sağlamaya yardım etmektedir. Kiazma formasyonu olmaksızın homolog çifti kutuplara rastgele sürüklenmekte ve aynı kutuplara birlikte taşınırsa anöploidi ile sonuçlanmaktadır. Kiazmanın olmaması mayoz rekombinasyon frekansında azalmaya sebep olan temel etkindir (30).

2.5. Down Sendromu Türleri

2.5.1. Trizomi 21

Taşıyıcılar 21. kromozomun 3 tekrarını içeren 47 kromozoma sahiptir. Down sendromu vakalarının yaklaşık %90' ını oluşturmaktadır. Nadiren meydana gelir bu nedenle tekrarlama riski düşüktür. Bu vakaların %85-90'i maternal mayoz hatalarından kaynaklanmaktadır. Maternal mayoz I hataları yaklaşık %75, maternal mayoz II hataları ise %20 oranındadır. Trizomi 21 vakalarının %5'i ise, mayoz I hatalarından daha sık görülen Mayoz II hatalarının gözlendiği paternal mayotik hatalardır. Post zigotik mitotik hatalar, bozulmuş maternal mayozun dominant etkisi mayoz I' de azalmış kiazmata sayısı ile ifade edilmektedir. Bu ilişkinin sebebi bilinmemektedir.

2.5.2. Robertsonian Translokasyonu

Trizomi 21, kromozom 13,14,15,21 ve 22 ile, 21. kromozomun dengesiz translokasyonuna verilen addır. Translokasyon eşlerinin sıklığı değişiklik gösterir ve heterokromatin kısa kolunda homologilerin bir sonucudur. Bu füzyon ürün inaktif sentromerle disentrik ya da monosentrik olabilmektedir.

Monosentrik translokasyon kromozomlarda, sentromer partnerlerin her birinden türeyebilir ya da onların her ikisinden ortaya çıkan bir hibrit yapı olabilmektedir. Robertsonian translokasyonu trizomi 21 olgularının yaklaşık %5' ini içermektedir. Taşıyıcılarda de-novo olarak oluşan %75 oranında iken %25' i aileseldir.

Dengeli Robertsonian translokasyon taşıyıcıları 45 kromozom, dengesiz olanlar 46 kromozoma sahiptir. Taşıyıcıların çoğunda iki kısa kol bölgesi kaybolmuştur. Bu iki NOR-bölgesinin kaybı dengeli translokasyon taşıyıcılarında klinik semptomlara öncülük etmez.

Rob 14q21q, en yaygın görülen translokasyondur. Ardıdan rob (21q21q) gelmektedir. Diğer translokasyonlar daha az sıklıkla görülmektedir. Dengeli translokasyona sahip kadınlar oosit polar yapısının yaklaşık %20'sinde anormal karyotipe sahiptirler erkekler ise spermlerinin %10-15' inde anormal karyotip göstermektedirler. Embriyo gelişiminde bu frekanslar azalmaktadır (30).

2.5.3. Resiprokal Translokasyon

Resiprokal translokasyon farklı otozom yada gonozomların ökromatini ile kromozom 21'in ökromatik bölgelerinin değişimi ile oluşmaktadır. Trizomik bölgelere ek olarak Kromozom 21' in farklı bölgelerinde aynı anda dengesiz formlar görülmektedir. Bu translokasyonlar standart trizomilerin 1:1000' inden daha az sıklıktadır (30).

2.5.4. Mozaikizm

Mozaik yapıdaki trizomi 21 sıklığı yaklaşık %3-5 ' tir. Gebeliğin erken postzigotik gelişimi süresince mitotik aberasyonlardan köken almaktadır. Zigot normal karyotipe sahip olabilir. Fakat postzigotik mitozda kromozom 21' in ayrılamaması gerçekleşir. Mozaik olarak kromozom 21' in yapısal aberasyonu genellikle postzigotik yeniden düzenlenmeler aracılığıyla olmaktadır (30).

2.6. Folat Eksikliğinin Etkisi

Yapılan bir çalışmada folat eksikliği anöploidi için bir risk faktörü olarak belirtilmiştir. Yetersiz folat içeren diyetle beslenmiş olan kadınlardan alınan lenfositlerde, anormal kromozom dağılımını temsil eden kinetokor pozitif mikronüklei frekansının arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada folatın eksik olduğu dönemden sonra folat desteği

bu sentromerik fragmentlerde önemli bir azalma ile ilişkilendirilmiştir. Maternal folat durumu ile uyuşan çok faktörlü gen-çevre interaksiyonlarını pozitif olarak destekleyen bu çalışmalar mayotik ayrılamama ve down sendromlu gebelik riskini ifade edebilir. Genetik ve/veya diyet faktörlerinden kaynaklanan metiyonin sentaz reaksiyonunda bir uzlaşma, oosit kromatin yapısında ve DNA metilasyon modelleri üzerine indirek etki ile normal kromozom dağılımına öncülük edebilmektedir. Tekrarlayan satellite sekanslarında perisentromerik heterokromatinin ikincil yapısı, kardeş kromatidlerin birleşmesine ve protein-DNA bağlama'ya dahil olmaktadır. Metil bağlı protein yokluğunda, MeCP2, tercihen, kromatin kondensasyonu ve bölgesel histon deasetilasyonunda sonuçlanan histon deasetilazda perisentromerik DNA'ya bağlanmaktadır (40).

Histon deasetilasyonu ve kromatin kondensasyonu için DNA metilasyonuna bağlı son değerlendirmeler, normal kromozom dağılımı için kromatin yapısında gerekli epigenetik değişimlere bağlı olabilen muhtemel DNA metilasyon modellerini desteklemektedir. Oositler gibi replike olmayan hücrelerde DNA'da metile CpG bölgelerinde metil gruplarının kaybı 5-metilsitozinin time spontan deaminasyonu ile ya da replikasyonla ilişkili DNA sarmalı değişiminde kesip çıkarma onarımı sırasında meydana gelebilir. DNA metiltransferazın yeni sentezlenen ipliklerde remetilasyonunun başarısızlığında, folat/metil yetersizliği koşullarında DNA metilasyon modellerinin sürekli eksikliği ile sonuçlanabilir (40).

Normal kromozom dağılımı için kararlı perisentromerik DNA metilasyonunun önemi bazı çalışmalarda vurgulanmıştır. Örneğin, seyrek görülen bir otozomal hastalık olan ICF 'li (immunodeficiency centromeric instability and facial anomalies) bireylerin lenfositleri, perisentromerik satellit DNA'nın seçici metilasyonu, kromozom dekondestasyonu ve kompleks çok merkezli (multiradiate) kromozomları içeren belirgin kromozom anomalilerini ortaya koymuştur. Bu hastalığın genetik orjininin de novo DNA metiltransferaz 3B (DNMT3B)'de bir mutasyon olduğu saptanmıştır. Bu durum DNA hipometilasyonu, perisentromerik dekondestasyon ve anormal kromozom dağılımı arasındaki ilişkinin bir sebebi olduğunu desteklemektedir. Folat eksikliği ve DNA hipometilasyonu arasındaki ilişki MTHFR polimorfizminin artan frekansının DS ve kromozomal ayrılamama ile ilişkili olabileceği ihtimalini desteklemektedir (40).

2.7. Folat Metabolizması

Folik asit, son dönemlerde biyolojik öneme sahip bir molekül olarak öne çıkmaktadır. Folik asit (folat) pteridin, p-aminobenzoik asit ve glutamik asitten oluşan pteroilglutamik asit yapısında, suda çözünen bir vitamindir. Folik asit ve türevleri başta pürin ve pirimidin homosistein ve metionin aminoasitlerinin metabolizması gibi önemli biyokimyasal olaylarda rol almaktadırlar. Bu nedenle de hematopoetik dokular, gastrointestinal kanal mukozası ve embriyonun gelişmesi gibi DNA yapım ve yıkımının hızlı olduğu dokularda folat esansiyel bir maddedir. Normal DNA ve protein sentezinde folik asit ve vitamin B12 nin gerekli olduğu bilinmektedir (41,42).

Yiyeceklerdeki folatlar, 5-metiltetrahidrofolat ve formiltetrahidrofolat olarak bulunmaktadır. 5- metiltetrahidrofolat, besinsel folatların en baskınıdır ve 5-metil-5,6-dihidrofolata kolayca okside edilir. Bu okside olmuş formunda, toplam besin folatlarının tamamını sunabilmektedir. 5 –metil-5,6-dihidrofolat, yemekten sonra midede etkin olan asit şartları altında hızlıca indirgenmektedir. Aynı koşullarda 5-metil tetrahidrofolat nispeten stabildir. Normal mide, bir konsantrasyon gradientine karşı lümene, nitrit ve reaktif oksijen metabolitlerinin güçlü bir inhibitörü olan askorbik asit salgılamaktadır. Askorbik asit 5-metil-5,6-dihidrofolat' ın asit koşullarında değerlendirilmesinde kritik bir faktör olabilir. Bu mekanizma besinlerden folatın biyoyararlılığının optimize edilmesinde önemli olabilir. Beslenme ile alınan folatın taşınımı, transmembran pH gradienti ile anyon değişim mekanizmasını devam ettiren süreçler aracılığıyla enterosit fırça membranında yapılır. Folat intraluminal pH' da anyoniktir. Proksimalde daha etkili olmasına rağmen, absorpsiyon jejunum boyunca devam eder. Poliglutamil folatlar, pteroil- γ -glutamil hidrolaz tarafından folilmonoglutamatlara dönüştürülür ve enterositlerde 5-metil tetrahidrofolata metobolize olmaktadır. Bu monoglutamil folat koenzimi, vitaminin plazma formudur ve B-12 ye bağlı metionin sentaz tarafından monoglutamil tetrahidrofolata dönüştürüldüğü periferel dokulara taşınmaktadır. Monoglutamil tetrahidrofolat, oligo- γ -glutamil tetrahidrofolat oluşturmak için glutamat parçalarını biraraya getiren folilpoliglutamat sentaz (FPGS) substratıdır. Bu reaksiyonun ürünü hexaglutamil tetrahidrofolattır (43,44,45,46,47,48,49,50,51,52).

2.7.1. Plasmada Folat

5-metil tetrahidrofolat portal sirkülasyonda serbest bırakılmaktadır. Bu folatın çoğu, karaciğerde tutulmaktadır, bir kısmı ise safrada serbest haldedir. Plasma 5-

metiltetrahidrofolat seviyesi, 3-30 ng/ml' dir. Devam eden folat yetersizliğinde vitamin desteği, hücrede ve enterohepatik döngüdeki folilpoliglutamat havuzundan sağlanmaktadır. Hücreye alımın azalması, hücresel folilpoliglutamat sentezinin azalmasına ve folilpoliglutamatların monoglutamatlara hidrolizinin artmasına öncülük etmektedir. Bu proses ekstraselüler plazmada kullanılabilir 5-metiltetrahidrofolatı arttırmaktadır. 5-metiltetrahidrofolat, endositoz reseptörleri aracılığı ile renal proksimal tübülde yeniden absorbe edilmektedir (52,53).

2.7.2. Eritrositlerde Folat

Bugün eritrositlerde folatın, 5-metiltetrahidrofolat ve formiltetrahidrofolat olarak bulunduğu bilinmektedir (54). Eritrosit folatı, metabolik role sahip değildir ve folat dengesinin devamı için uzun süreli bir tampon olarak düşünülmektedir. Yaşlı eritrositlerde folat, retiküloendotelyal sistem tarafından değerlendirilmektedir. Daha sonra karaciğere taşınmakta ve enterohepatik döngü aracılığı ile safrada periferel dokulara yeniden dağılmaktadır (52).

2.7.3. Hücresel Transport

Hücresel transport sistemleri iki sınıfa ayrılabilir. Birincisi, membran taşıyıcılarını içermektedir. Karaciğer hücrelerinde folat taşınımı enerjiye bağlıdır ve elektronötral folat hidrojen kotransporterlar vardır. Taşınım anyon değişim mekanizması ile gerçekleşmektedir. Mitokondri ise spesifik folat taşıyıcılarına sahiptir. Hücresel folat taşınımının ikinci sınıfı glikosilfosfotidil inozitol ile plazma mebranına bağlı spesifik folat bağlayıcı proteindir ve bu protein belirli epitelyal hücrelerin apikal mebranında yer almaktadır. Bu yüksek afiniteli folilkoenzimlere bağlanabilmektedir (52,55,56,57,58).

2.8. Tek Karbon Transfer Reaksiyonlarında Folat Koenzimleri

Folatın metabolik rolü, oksidasyonun değişik düzeylerinde ortaya çıkan tek karbon birimlerini taşımasıdır. Tek karbon transfer reaksiyonlarından en önemli 5 tanesi; serinin glisine dönüşümü, histidin katabolizması, timidilat, metionin ve pürin sentezidir. Bu reaksiyonlar, FADH₂ ve NADPH gibi koenzimler ve spesifik enzim sistemleri aracılığı ile kolaylaştırılmış, farklı elektron transfer basamaklarında yer almaktadır. Folat hücrelere 5-metiltetrahidrofolat olarak girmektedir. Folatın hücresel alımı için B₁₂'ye bağlı

metionin sentaz oranı sınırlayıcıdır. Çünkü bu enzim 5-metiltetrahidrofolatın tetrahidrofolat üretimi için gereklidir (52,59).

Folata bağlı tek karbon metabolizmasında tek karbon birimlerinin ana orjini SHMT (serinhidroksimetiltransferaz) tarafından katalizlenen reaksiyonda serin'in beta karbonudur. Bu reaksiyonda glisin oluşturulur ve tetrahidrofolat 5-10 metilentetrahidrofolata dönüştürülür (52).

2.8.1. Histidin Katabolizması

FIGLU (formiminoglutamik asit) histidin yıkımından oluşmaktadır. Histidin yüklemesinden sonra FIGLU atılımı folat yetersizliği için yararlanılan bir testdir. FIGLU'nun formimino grubunun tetrahidrofolata transferi 5-10-metheniltetrahidrofolat oluşturur (52).

2.8.2. Pürin ve Pirimidin Nükleotid Sentezi

Folik asit türevlerinin en önemli görevidir. Pirimidin nükleotidlerinin sentezinde 5,10-metilentetrahidrofolat, timidilatmonofosfat (TMP) oluşturmak için deoksiüridilatmonofosfatı (dUMP) metiller. TMP, DNA oluşumunda sınırlayıcı timidilat sentaz (TS) için gereklidir. Metotraksat gibi antifolat kemoterapik ilaçlar dihidrofolata benzer ve dihidrofolatı tetrahidrofolata dönüştüren dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimini inhibe eder. TMP oluşumu, tümör hücrelerinin hızlı bölünmesinde DNA sentezinin inhibisyonuna öncülük eden tetrahidrofolatın düşük oranlarına karşı hassastır. TS ekspresyonu hücre döngüsünün S fazı boyunca pik noktadadır ve replikasyon oranı ile ilişkilidir. Poliriferasyondaki hücrelerde TS artışı dihidrofolat seviyesini arttırmaktadır. Dihidrofolat, 5-10 metilentetrahidrofolatredüktaz enzimini inhibe etmektedir ve nükleik asit sentezine öncelik tanıyan düzenleyici bir mekanizma sağlamaktadır (60).

2.8.3. Serin ve Glisin Dönüşümü

SHMT (serinhidroksimetiltransferaz), serin ve glisin'in birbirine dönüştürülmesi, geri dönüşümlü olarak katalizlemektedir. Bu reaksiyon kofaktör olarak B6 ya ihtiyaç duymaktadır ve oksidasyonun formaldehit düzeyinde tek karbon havuzunda serin'in beta karbonunu sunmaktadır.

Tetrahidrofolat+serin+NAD⁺ ↔ 5,10-metilentetrahidrofolat+glisin+H₂O. 5,10-metilentetrahidrofolat

5,10-metilentetrahidrofolat, 5-metiltetrahidrofolat oluşturmak için 5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz tarafından kullanılmasına rağmen DNA'nın timidin ve pürin sentezinde metilentetrahidrofolat dehidrogenaz ve Timidilat Sentaz için' de gereklidir. Bu nedenle 5-10 metilentetrahidrofolat bu üç önemli kavşak için dallanma noktasıdır (59,61).

2.8.4. Homosistein Remetilasyon Döngüsü

Homosistein iki önemli yolda yer almaktadır ve bazı enzimler tarafından regüle edilmektedir. De novo metionin biyosentezi, sistationin beta sentaz (stimüle edici) ve 5,10-MTHFR (inhibe edici) arasında S-adenosilmetionin (SAM) tarafından düzenlenen transsülfürasyon (sistationine) yolağıdır. Homosistein remetilasyon döngüsünde, 5,10-metilentetrahidrofolat 5,10-MTHFR aracılığı ile 5-metiltetrahidrofolata indirgenmektedir. Bu reaksiyon 5-metiltetrahidrofolat oluşturma yeteneğindeki tek reaksiyondur ve geriye dönüşümsüzdür. B12'ye bağlı metionin sentaz daha sonra homosisteini metionine dönüştürür (5-metiltetrahidrofolatı kullanan ve tetrahidrofolat oluşturan bir proses). Bu son aşama Metionin sentazı aktive eden metionin sentaz redüktaz enzimini gerektirmektedir. Bu enzim son zamanlarda keşfedilmiştir. Homosisteinin metionine dönüşümü için betain kullanımı homosistein metiltransferazı (B12'den bağımsız betain enzimi) kapsamaktadır. De novo sentez edilen metionin ATP ve metil vericisi SAM (adrenalin, fosfotidil kolin ve karnitin gibi bazı önemli biyomoleküllerin metillenmesinde metil vericisidir) için gerekli olan metionin adenosil transferaz tarafından aktive edilebilir. Bu proses süresince SAM, yeni bir remetilasyon döngüsünün yeniden başlaması için homosisteine hidrolize olan S-adenosilhomosisteine (SAH) dönüştürülmektedir. Bu omurgalılarda homosistein üretimi için tek yoldur. Homosisteinin transsülfürasyonu, sistationin betasentaz tarafından katalizlenen, sistationin oluşturmak için serinle yoğunlaştırılmasını gerektirmektedir. Sistationin, B6'ya bağlı gama sistationaz tarafından sistein ve alfa ketobütirata hidrolize edilir. Remetilasyon ve transsülfürasyon yollarının metabolik düzenlenmesi, homosistein kullanımını koordine eden SAM'in etkisi altındadır. SAM, sistationin beta sentazı aktive ederken, 5,10-MTHFR'yi inhibe etmektedir. Bu nedenle, SAM seviyesi düştüğünde, sistationin oluşumu azaltılırken 5-metiltetrahidrofolat oluşumu sınırlandırılmaz. Bu durumda homosistein metionin üretimi için muhafaza

edilmektedir. Tersine, yüksek SAM seviyesi, sistationin betasentazın aktivasyonundan dolayı homosisteinin sülfürasyonunu arttırmaktadır (59,62,63,64,65,66,67,68,69). İnsanlarda metil grupları kullanımı, besinle kazandıkları metioninden fazladır. Bu eksiklik 5-metiltetrahidrofolat ve betainden telafi edilmektedir. SAM'in oluşumunda aktif metil gurupları için devamlı olan gereksinim kreatin oluşumu ile sonuçlanmaktadır (52).

Kısaca, folat başlangıçta 5-metiltetrahidrofolata dönüşmekte, B12 vitaminine bağlı metionin sentetazın katalize ettiği bir reaksiyon yoluyla homosistein ile birleşmekte ve L-metionin ortaya çıkmaktadır. Metioninin oluşumu bu yolla ve bir miktar diyetle alım şeklindedir. Metionin, metionin adenoazin transferaz enzimi aracılığı ile ATP ile birleşir ve S-adenozil metionin (SAM) ortaya çıkar. SAM ise merkezi sinir sisteminde gerçekleşen 35 kadar transmetilasyon reaksiyonundan sorumludur. (folat metabolizması). Folatlar ilk kez 1940'larda sentezlenmiş, başlangıçta tüm işlevlerinin hemopoetik alanda olduğu düşünülmüştür. Oysa bugün bu vitaminin doğum kusurlarını önlediği ve kardiyovasküler alandaki etkileri bilinmektedir (70,71).

2.8.5. Folat ve Embriyonik Gelişim

Gebelikten önce ve gebelik süresince folat alımı, doğum kusurlarının oluşmasına veya yeniden meydana gelmesine karşı koruyucu olabilmektedir. Ek olarak son yıllarda homosistein, koroner arteri ve trombotik hastalıklar için bağımsız bir risk faktörü olarak gösterilmektedir. Folat, toplam plazma homosistein (tHcy) düzeyinin düşürülmesi için etkili bir yoldur (72,73).

Gebelik, folat katabolizmasının artışı ve serum ve eritrosit folat düzeylerinin azalışı ile ilişkilidir. İnsanlarda, doğum ağırlığı ve boy uzunluğu maternal ve neonatal folat düzeyleri ile ilişkilendirilmiştir. Folat yetersizliği kobalamin yetersizliği kadar NTD (Nöral Tüp Defekti) için bir risk faktörü olarak sunulmaktadır. Hiperhomosisteinemi folat ya da kobalamin yetersizliği ile meydana gelebilir ve NTD için bir risk faktörüdür. Fetal gelişim boyunca folata bağlı enzimlerin aktivitesindeki değişiklikler Metilen tetrahidrofolat artışını ve fetusta homosistein hassasiyetindeki artışı desteklemektedir. Folat yetersizliğinin teratojenik etkileri, DNA sentezinde değişiklik, sitogenetik hasar ya da DNA metilasyonunda anormalliklere öncülük eden folata bağlı enzimlerin azalan aktivitesi ile ortaya çıkabilir (74) .

Folatlar, histidin, metionin, homosistein, serin ve glisin amino asitlerinin metabolizması için gerekli tek karbon birimlerinin transferi ve pürin ve pirimidinlerin

sentezini içeren biyokimyasal reaksiyonların çoğunda yer almaktadır. Folat, esansiyel amino asit olan metionin metabolizmasında ciddi öneme sahiptir. Adenosilmetionin, DNA metilasyonu ve nörotransmitter üretimini içeren biyolojik metilasyon reaksiyonlarında başlıca metil vericisidir. DNA metilasyonu, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde ve gelişme süresince hücrelerin farklılaşmasında rol oynamaktadır. Homosisteinin metionine remetilasyonu, metionin sentaz enzimi aracılığı ile katalizlenmektedir ve bu reaksiyon metiltetrahidrofolattan metil gurubunun bulunabilirliğine bağlıdır. Homosisteinin metionine remetilasyonu için gerekli metiltetrahidrofolattan meydana gelen MTHFR' nin aktivitesi fetal gelişim süresince yüksektir fakat doğumdan önce azalır. Metionin sentaz aktivitesinin, ikinci trimesterdeki karaciğer ve böbreklerde arttığı bildirilmiştir (74).

2.8.6. Folat Yetersizliğinin Teratojenik Etkisi

Folat eksikliğinin teratojenik etkisi için mümkün mekanizmalardan biri, DNA sentezinde değişiklik yapmak için öncülük eden folata bağlı enzimlerin aktivitesinde azalmadır. DNA biyosentezi dihidrofolat üretir. Bu da katabolize olabilen bir folat türüdür. Gebelikte folat katabolizmasının pik yaptığı dönem hipertrofik büyümeye geçişin olduğu dönemdir. Folatlar ve antifolatlar doz ve zamanla ilişkili farklı etkilere sahip olabilirler. Kromozomal fragil bölgelerin varlığı insanlarda yaygındır. Birçok durumda herhangi bir fenotipik anomali ile ilişkili olmamasına rağmen belli fragil bölgelerin meydana gelmesi diyetle alınan folatın yetersizliği ile meydana gelen karsinogenezis ile ilişkilidir.

Remetilasyon yolunda, metiltetrahidrofolattan metil gurubu homosisteine transfer olur ve daha sonra metionin adenosil metionine aktive edilir. Besinsel metiyonin verme bu önemli metil vericisinin üretiminde artışa yol açar. Fare embriyolarında, adenosinhomosistein hidrolaz enzimi için kodlanan gendeki mutasyon embriyonik ölümlere öncülük etmektedir. Bu mutasyonun metilasyon reaksiyonlarını inhibe eden hücrel adenosilhomosistein düzeylerini arttıracakını düşündürmektedir.

2.9. Homosistein Metabolizması

Homosistein (Hcy) ilk olarak 1932 yılında Butz ve Du Vigneaud tarafından tanımlanan sülfür içeren bir aminoasittir. Hcy metabolizmasındaki bazı enzim defektleri sonucu ciddi biçimde artmış hcy seviyeleri ile seyreden ve homosistinuri denilen hastalık ortaya çıkmaktadır. Methioninin son ürünü olan homosistein metabolizmasında

genetik ya da edinsel bozukluklar sonrasında ortaya çıkan hiperhomosisteinemi ise inme, VTE (venöz tromboembolizm), koroner ve periferik arter hastalıkları için bağımsız bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. İlk olarak 1969 yılında Mc Kully ve arkadaşları ile başlayan pek çok çalışmada yüksek Hcy düzeylerinin kardiyovasküler hastalıklar için güçlü bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Serbest sülfhidril grubu taşıyan bir aminoasit olan hcy diyetle alınmaz, proteinlerin yapısına katılmaz ve sadece metiyonin metabolizmasının bir ara ürünü olarak vücutta oluşturulur. Hcy'nin metilasyonla metiyonin'e dönüştürülmesi B12, transsülfürasyonla sisteine dönüştürülmesi ise B6 vitaminine bağımlı enzimatik reaksiyonlardır. Normal koşullarda hcy üretimi ve metabolizması arasında sıkı bir denge mevcuttur. Plazma homosistein düzeyi, popülasyonlar arasında farklılık göstermesine rağmen, normal plazma homosistein düzeyi 5-15 mmol/L olarak kabul edilmektedir. Homosistein düzeyi; metabolizmadaki genetik bozukluklar (enzim defektleri gibi), kronik hastalıklar, vitamin ve beslenme eksiklikleri, kişisel özellikler (yaş, cinsiyet vb.) ve bazı ilaçlardan etkilenmektedir. Özellikle; homosistein düzeyi yaşla birlikte artış göstermekte olup, erkeklerde bayanlara göre daha yüksektir. Artmış plazma homosistein düzeyi hiperhomosisteinemiye ve dolayısıyla homosisteinüriye neden olmaktadır. Artan plazma homosistein düzeyi, arteriyel ve venöz trombozis, inme, miyokardiyal infarkt ve kronik renal yetersizlik gibi birçok hastalıklar için önemli risk faktörüdür. Artan homosistein düzeyi, folik asit alınımı ile normal seviyelere çekilebilir. Bu nedenle birçok hastalık için risk faktörü olan plazma homosisteinindeki artışın nedeninin araştırılması ve diyetle normal düzeylere çekilmesi sağlık açısından önem taşımaktadır (75).

2.9.1. Homosistein ve Embriyonik Gelişim

Folat eksikliğinden kaynaklanan homosisteinin birikimi plazmada artan homosistein düzeyleri ile sonuçlanmaktadır. Artmış intraselüler ve extraselüler değerler sitotoksik olmak için uygun değerlerdir. Homosisteinin yüksek konsantrasyonları in vitro üretilen fare embriyoları için embriyotoksiktir. Fetal kayıplarda artış sistatinyonin beta sentaz eksikliğinden dolayı homosisteinuria'lı bayanlarda rapor edilmiştir. Maternal plazmada homosistein düzeyinin artması NTD, tekrarlayan spontan düşükler ve plasental bozukluklar için risk faktörü olarak ileri sürülmüştür. Foliküler sıvıda ve amniyon

sıvısında homosistein düzeyleri plazmadaki ile önemli ilişki içerisindedir. Ntd'li yavruya sahip annelerin amniyotik sıvısında homosistein düzeyinin arttığı görülmüştür (74).

2.10. MTHFR Aktivitesi

Folat, bir çok yiyecekte doğal olarak oluşan temel B vitaminidir. Memeliler folatı sentezleyemezler. Yetersiz folat alımı nöral tüp defektleri, down sendromu, kardiyovasküler hastalıklar, alzheimer ve çeşitli kanserlerin artan riskleri ile ilgilidir. Folat, dUMP'den dTMP sentezi için gerekmektedir. (dUMP, metionin ve SAM üretimi için gereklidir, SAM ise fragil bölgeler ve sentromer gibi spesifik bölgelerde kromozomal fragilitiyi engeller ve DNA metilasyonu için birincil metil vericisidir.) Folat eksikliğinin, SAM ve dTMP sentezini azaltma, CpG hipometilasyonu ve DNA'da fazla urasil birleştirme gibi etkileri vardır. Fazla urasil birleşmesi nokta mutasyonu oluşumuna ve kromozom kırıklarına yol açabilir. Ek olarak azalmış dTMP sentezi, tümör gelişiminde fonksiyonu olduğu varsayılan folata hassas fragil bölgelerin ekspresyonu ile ilişkilidir. Sentromerik DNA'nın hipometilasyonu, 1, 9 ve 16. kromozomlar gibi spesifik kromozom kırıklarının yanı sıra kromozom kayıpları ile sonuçlanır. Son zamanlarda, folik asit ya da 5-metiltetrahidrofolat eksikliğinin kültüre alınmış insan lenfositlerinde 17 ve 21. kromozomların anöploidi oranını arttırabildiği gösterilmiştir (76).

Folat döngüsü iki temel fizyolojik aşama içermektedir, 1) DNA sentezi ve tamiri için pürin ve pirimidinlerin sentezi, 2) metionin döngüsüyle ilişkili metilasyon. Bu iki yol iki temel reaksiyon vasıtasıyla etkili bir şekilde dengelenmektedir. Bunlardan birincisi, metilasyon aşamaları için en önemli metil vericisi olan S-adenozilmetionin (SAM) oluşturmak için homosisteinin re-metilasyonudur (özellikle embriyonik gelişimin başlangıç periyotları boyunca önemlidir). Metil grubunun transferinden sonra SAM, DNA metilasyonu için gerekli metiltransferazın inhibitörü S-adenozilhomosisteine dönüşmektedir (SAH). SAH, SAH hidrolaz tarafından katalizlenen bir reaksiyonda dönüştürülen homosistein kaynağıdır. İkinci reaksiyon, döngüden homosisteini uzaklaştıran sistatyon beta sentaz (CBS) aracılığı ile sistein ve glutatyon üreten trans-sulfurasyon yoludur.

Bu iki yolun (re-metilasyon ve trans-sulfuration) metabolik düzenlenmesi homosisteinin nasıl kullanılacağını koordine eden SAM'in etkisi altındadır. Aslında SAM, CBS'yi aktive ederken 5,10-MTHFR'yi inhibe etmektedir. Bu nedenle SAM seviyesi azaldığında 5-metil tetrahidrofolat (5-CH₃-THF) oluşumu sınırsızdır. SAM seviyesi

The diagram illustrates the folate cycle and its connection to methionine metabolism and DNA methylation. The cycle involves the interconversion of various folate derivatives, including 5,10-methylenetetrahydrofolate (5,10-CH₂-THF), 5-methyltetrahydrofolate (5-CH₃-THF), and 5,10-methylenetetrahydrofolate (5,10-CH₂-THF). Key enzymes involved include MTHFR, MTRR, MTR, and DNA methyltransferase. The cycle is regulated by vitamins B₁₂ and B₆. The diagram also shows the conversion of methionine to SAM (S-adenosylmethionine), which is used for DNA methylation, and the conversion of homocysteine to cystathionine and then to cysteine and glutathione. The diagram is divided into two main sections by a vertical dashed line: the left section focuses on the folate cycle and its role in DNA synthesis, while the right section focuses on the methionine cycle and its role in DNA methylation.

```

graph TD
    subgraph Folate_Cycle [Folate Cycle]
        DHF --> THF
        THF --> 510CH2THF[5,10-CH2-THF]
        510CH2THF --> 5CH3THF[5-CH3-THF]
        5CH3THF --> 510CH2THF
        510CH2THF --> 10formylTHF[10-formyl-THF]
        10formylTHF --> 5formylTHF[5-formyl-THF]
        5formylTHF --> 510methenylTHF[5,10-methenyl-THF]
        510methenylTHF --> 510CH2THF
        510CH2THF --> dUMP
        dUMP --> dTMP
        dTMP --> Purine_synthesis[Purine synthesis]
        dTMP --> Thymine_synthesis[Thymine synthesis]
        Nutrition --> 5CH3THF
    end

    subgraph Methionine_Cycle [Methionine Cycle]
        Methionine --> SAM
        SAM --> SAH
        SAH --> Homocysteine
        Homocysteine --> Cystathionine
        Cystathionine --> Cysteine
        Cysteine --> Glutathione
        Homocysteine --> 5CH3THF
        5CH3THF --> Homocysteine
        B12 --> MTRR
        MTRR --> MTR
        MTR --> Homocysteine
        B6 --> CBS
        CBS --> Cystathionine
    end

    SAM --> DNA_Methylation[Methylation of CpG dinucleotide, and epigenetic modification in mammalian DNA]
    CH3_Cytosine_DNA[CH3 cytosine-DNA] --> DNA_Methylation
  
```

TMP: Timidilat monofosfat,
DHF: Dihidrofolat,
THF: Tetrahidrofolat,
CBS: Sistasyon beta sentaz

19

- Metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR): 5,10-metilenTHF 'yi, homosisteinin metionine remetilasyonu için metil vericisi olan 5-metilTHF'ye dönüşümünü katalizler,
- Metionin sentaz (MS): homosisteinin metionine remetilasyonunu katalizler,
- Metionin SAM oluşturmak için ATP ile reaksiyona girer. SAM, en önemli metil vericisidir ve CBS (sistatyon beta sentaz)' ın stimülasyonu ve 5,10-MTHFR'nin inhibisyonu ile kendi sentezini düzenler.
- Metionin sentaz redüktaz, metionin sentaz enzim kompleksinde kobalamin aktivasyonu için gereklidir (78).

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) folat metabolizmasında anahtar bir enzimdir. MTHFR, 1998 yılında klonlanmış olup 102 bp'den 432 bp'ye değişen uzunluklarda 11 ekzondan oluşmaktadır. MTHFR geni birinci kromozom (1p36.3) üzerinde yer almaktadır. Folik asit ve MTHFR kompleks biyokimyasal yollar içermektedir. Normal MTHFR aktivitesi metionin ve folat döngüsünün devamına yardımcı olabilir ve homosistein oluşumunu önler (79,80). MTHFR, 5,10 metilentetrahidrofolatın (CH₂-THF) , homosisteinin metionine remetilasyonu için elzem olan 5-metiltetrahidrofolata (CH₃-THF) indirgenmesi için gerekli bir enzimdir (81). 5-metiltetrahidrofolat DNA metilasyonu ve metiyonin sentezi için metil grubu sağlar. Bu nedenle MTHFR, nükleik asit sentezinde ve metilasyon reaksiyonları arasında bir karbonun dağılımının düzenlenmesinde anahtar enzimdir (82). Bu enzimatik varyantlar, S-adenosilmetionin/S-adenozilhomosistein değerinde ve; serumda yüksek homosistein oranları ve S-adenosilmetionin sentezindeki değişikliklerle maternal hipometilasyon durumunu yansıtan metabolik yollara yardımcı olacak potansiyele sahiptir (83). 5-metiltetrahidrofolat, s-adenosil metionin için metionin aktivasyonunu sağlar. Bu aynı metil gurubu DNA'yı da içeren çok çeşitli bileşenlerde metilat olarak kullanılabilir. Alternatif olarak 5,10-metilentetrahidrofolatın tek karbon birimi DNA ve/veya RNA sentezi içinde kullanılabilir. MTHFR, folat dağılımını, homosistein metabolizmasını ve S-adenosilmetionin vasıtasıyla metilasyonu etkilediği için MTHFR' de genetik kusurlar hastalık riskini negatif ve pozitif olarak ayarlama potansiyeline sahiptir (84).

MTHFR, dTMP sentezi ve metilasyonun devam etmesi için folatın biyoyararlılığını etkileyen folat metionin yolunda önemli bir enzimdir. MTHFR, 5,10

monomerde katalitik domain 677. pozisyonda, düzenleyici domain 1298. Pozisyonda yer almaktadır (77).

MTHFR enzimatik aktivitesi, farklı yollarda etkili olabilmektedir. Gen sekansında polimorfizmler ya kofaktörü FAD'ın ya da substratı için enzim afinitesini değiştirebilir. Metionin ya da SAM'in yüksek konsantrasyonları MTHFR aktivitesi için inhibitördür ve sonunda FAD kofaktörünün yetersiz konsantrasyonu enzimatik aktiviteyi azaltmaya yol açabilir. MTHFR aktivitesinin azaldığı durumlarda, 5-10-metilentetrahidrofolat konsantrasyonu artmakta, 5-metiltetrahidrofolat konsantrasyonu düşmektedir. Bu değişim dengede iken urasil birleşimini azaltarak kromozom kırıklarının sayısında meydana gelen bir azalma CpG adacıklarında metilasyonu arttırarak dTTP sentezini desteklemektedir. Azalan MTHFR aktivitesi sonucunda 5-metil THF düzeyi azalmakta, 5,10- metilen THF miktarı ile plazma homosistein düzeyi artmaktadır. MTHFR enzimi, plazma total homosistein (tHcy) konsantrasyonunda artış ve kardiovasküler risk artışı ile ilişkili termolabil enzim varyantı olarak Kang ve ark. tarafından ortaya çıkarılmıştır. tHcy konsantrasyonları bazı hastalıklarda artmaktadır. Folatlar, kobalamin, B6 ve riboflavin gibi B vitaminlerin alımı, yaşam tarzı, fizyolojik ve genetik faktörler ile tHcy konsantrasyonu belirlenmektedir (85).

2.12. MTHFR Polimorfizmleri

MTHFR geninde birçok polimorfizm literatürde bildirilmiştir. Diğer taraftan, populasyon dinamikleri ve hastalıklarla ilişkili olarak birkaç tanesi çalışılmıştır.

MTHFR C677T polimorfizmi: 4. ekzon 677. Pozisyonda sitozinin timine transisyonudur. Enzim aktivitesinde azalma ve alaninin valin yerine geçmesi ile sonuçlanmaktadır. Bu C677T transisyonu, 37°C de enzim aktivitesini azaltarak termolabiliteye sebep olan bir mutasyondur. Normal CC genotipi ile karşılaştırıldığında CT heterozigot ve TT homozigot enzim aktivitesi sırası ile %35 ve %70 azalmaktadır. T alleli için homozigotluk, Hcy seviyesini orta derecede yükselten azalmış enzim aktivitesi ile ilişkilidir (80).

MTHFR A1298C polimorfizmi: 7.ekzon 1298. Pozisyonda adeninin sitozine transisyonudur. Glutamatın alanine değişimi ile sonuçlanır. Bu mutasyon mboII tanıma bölgesinde değişiklik yapar ve %33 allel frekansına sahiptir. Enzim aktivitesi azalır fakat C677T allelindeki azalma ile aynı ölçüde değildir. A1298C nin ne homozigot ne de

heterozigot durumu, yüksek homosistein konsantrasyonuna ya da C677T homozigot durumu için belirgin olan düşük folat konsantrasyonuna etki etmektedir. Ayrıca, azalan MTHFR aktivitesi ile ilişkili olarak, down sendromlu çocukların annelerinin yüksek frekansta MTHFR C677T (Ala222Val) ve A1298C (Glu429Ala)'nin heterozigot polimorfizmine sahip olduğu belirtilmiştir (80).

Folat, MTHFR genotipi ve onun kofaktörü riboflavin arasındaki ilişki karmaşıktır. 1-Folat konsantrasyonu arttığında, kırılma-füzyon ve anöploididen kaynaklanan genomik instabilite azalır. 2-Yüksek MTHFR aktivitesinde genom hipometilasyonu ve anöploidi azalır. 3- Kırılma-füzyon döngüsü riski yüksek riboflavin ve düşük folat durumlarında artmaktadır. 4-Genom hipometilasyonu ve anöploidi riski düşük riboflavin ve düşük folat durumlarında artmaktadır. Bu karmaşık ilişki MTHFR C677T (rs1801133) polimorfizminin önemli klinik sonuçlar için nasıl bir risk olduğunu açıklayabilmektedir. Kırılma-füzyon döngüleri ve kromozom kırıklarının önlenmesi, lösemi ve lenfoma gibi durumlar ile ilişkili olabilen DNA'da urasil inkorporasyonu aracılığı ile gerçekleşir (80).

2.13. MTHFR Polimorfizmlerinin Bazı Hastalıklarla İlişkisi

Düşük folat alımının artan kanser riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. MTHFR ve kanser arasındaki ilişki farklı kanserlerde araştırılmıştır. C677T homozigotluğu endometrial kanser riskini 2.8 kat arttırmıştır. Oysaki ovaryum tümürlü hastalarda MTHFR geninde delesyonlar gözlenmiştir. Tersine, farklı çalışmalar TT homozigotlarında kolorektal kanser riskini 1.2-3 kat, akut lösemi riskini 4.3 kat azalttığını göstermiştir. Fakat, koruyucu etkisi folatı yetersiz olan bireylerde kaybolabilmektedir. Bazı çalışmalar A1298C (rs1801131) polimorfizmi ve kolorektal kanser riski arasında ilişki olduğunu belirtmiştir. Bütün çalışmalarda, CC bireylerinde AA ile karşılaştırıldığında indirgenmiş bir riske sahip olduğu gözlenmiştir (80).

Yapılan çalışmalarda 677T homozigotlarına sahip bireylerde diğer MTHFR genotipleri ile karşılaştırıldığında koroner kalp hastalığı için %19 daha yüksek riske sahip olduğu belirtilmiştir. MTHFR genotiplerinde 72 çalışmayı aşkın bir meta analiz, MTHFR mutasyonlu insanlarda kalp hastalıkları, tromboz ya da akciğer damarlarında tıkanıklığa sahip olma riskini arttırmakta olduğunu göstermiştir (79). Diğer taraftan 60 koroner ateroskleroz hastası ile yapılan başka bir çalışmada MTHFR 677 C-T ve 1298 A-C polimorfizmlerinin koroner arter hastalıklarının gelişiminde ve tıkalı damar oluşumunda etkisinin olmadığı ileri sürülmüştür (86).

Tek karbon folat metabolizmasının anahtar moleküllerinden folik asit ve homosistein gebeliğin devamı için önemlidir. Folat, DNA sentezi ve hücre bölünmesi için gereklidir ve tek karbon metabolizma yolağında metabolize olmaktadır. Bu nedenle plasenta gibi hızlı büyüyen doku için folat gerekli bir faktördür. Plasenta anneden bebeğe nutrientlerin transferi için bir kanal olarak görev yapmaktadır. Folat bazı aminoasitlerin metabolizması için substrat olarak davranır, transmetilasyon ve transsulfürasyon yollarında yer almaktadır. Hiperhomosistenemia, nöral tüp defektleri, plasental bozukluklar ya da preeklamsi gibi gebelikle ilişkili hastalıklar için risk faktörü olarak görülmektedir. Hiperhomosistenimia, folik asit, vitaminler ve diğer besleyicilerin yetersiz alımından dolayı artmaktadır ya da tek karbon folat metabolizmasında yer alan enzimlerin etkinliğindeki değişiklikten kaynaklanmaktadır. MTHFR, genom stabilitesi, imprinting, ekspresyon ve kanda homosistein değerini yeterli olarak devam ettirmeyi etkileyen bir dizi fizyolojik prosesin yer aldığı folat ve homosistein metabolik yollarında önemli bir enzimdir. homosistein/folat yoluyla ilişkili hastalıkları araştırmak için önemli bir aday enzim olan metilentetrahidrofolatı kodlar (87).

MTHFR'nin gebelikteki önemine bakıldığında, bu gendeki nükleotid varyasyonlarının gebelerde sonucu etkileyebildiği düşünülmektedir. Rohini ve ark., yaptıkları araştırmada, A1298C, C alleli ve homozigot genotiplerin tekrarlayan gebelik kayıp riskini önemli ölçüde arttırdığını saptamışlardır. Benzer şekilde A1298C polimorfizmi için yapılan meta analizde tekrarlayan gebelik kayıplarında ve spontan abort embriyolarında AC ve CC genotip taşıyıcılığının önemli oranda arttığı gösterilmiştir (87).

Down sendromu ya da trisomi 21, 21. kromozomda yer alan genlerin 3 kopyasının ekspresyonuna bağlı en sık görülen genetik hastalıktır. Bu durum, olguların yaklaşık %90'ında mayoz süresince maternal nondisjunctiondan kaynaklanmaktadır. Nondisjunction gebelikten önce oosit maturasyonunda I.mayoz süresince meydana gelir. Mayotik nondisjunction henüz aydınlatılamamıştır. Kromozomal nondisjunction ve folat metabolizması arasındaki ilişki son yıllarda ilgi çekmeye başlamıştır. Folat, bölünme ve diğer aşamalarda epigenetik düzenleyici olan hücresel metilasyon reaksiyonlarındaki görevinden dolayı, hücre bölünmesi boyunca genetik materyal dağılımı aşamalarında önemli bir role sahiptir.

Kronik folat ve metil eksikliği; anormal DNA metilasyonu, DNA kırıkları ve kromozom ayrılmasında kusurlarla sonuçlanmaktadır. Klinik ve deneysel çalışmalar,

genomik DNA hipometilasyonunun kromozomal değişme ve anormal segregasyonla ilişkili olduğunu göstermektedir. Bir dizi genetik ve beslenme gibi çevresel faktörler, anöploidizasyonda interaktif bir rol sağlarlar. Down sendromu aynı zamanda anormal homosistein metabolizması ile de bağlantılıdır. DS' da mayotik nondisjunction altında yatan hücresel ve moleküler mekanizmalar bilinmemektedir. Anne yaşı, DS riski ile inkar edilemez ilişkili olan tek faktördür. Yakın zamanlarda, DNA metilasyonundaki bir kusur mayotik ayrılamamanın potansiyel bir nedeni olarak belirtilmektedir. Bu hipoteze göre sentromerlerin hipometilasyonu, kinetokor ve mikrotübüllerin formasyonunda anomalilere yol açmaktadır. Sentromerik hipometilasyon için gerekli genetik faktörler arasında SAM' in düzenlenmesinde önemli rol oynayan MTRR ve MTHFR'dir (83).

MTHFR, metiyonin sentaz reaksiyonunu desteklemek için, folat ve B12 ' ye ihtiyaç duyduğundan, MTHFR polimorfizminin metabolik etkisi folat ve B12 nin düşük seviyelerinde daha da artmaktadır.

Son dönemlerde bazı çalışmalar MTHFR 677 C/T polimorfizmi ve aşırı sigara tüketimini DS için maternal risk faktörü olarak görmektedir. Düşük folat seviyesi de bu potansiyel risk faktörlerinin her biri ile ilişkilidir.

2.14. MTHFR-Çevre etkileşimleri

Bazı çalışmalarda, beslenme durumu ve C677T polimorfizmi arasında ilişki klinik sonuçlar için araştırılmıştır. Bazılarında nöral tüp defektleri ile ilişkili C677T, TT homozigotluğunun beslenme durumuna bağlı olabileceğini göstermiştir. Hücrelerde folat değeri düştüğünde spina bifida için riskin 13 kat arttığı bildirilmiştir. Maternal multivitamin kullanımı TT homozigotları ve heterozigotlarda spina bifida için riski azaltmaktadır. Kolorektal kanser için yapılan araştırmalar yüksek folat ya da metionin alımının C677T, TT homozigotluğu ile ters ilişkili olduğunu göstermiştir. Diyetle metil desteği yüksek olduğunda, TT bireylerde kolarektal kanser için risk azalabilir. Benzer şekilde, fazla miktarda alkol tüketen TT homozigotları, T alleleline sahip olmayan ancak benzer miktarda alkol tüketenlerden daha fazla riske sahiptir. 5-metiltetrahidrofolat alkol tüketimiyle azaldığında, TT bireyler bu durumu daha az oranda dengeleyebilirler (80).

2.15. MTHFR –Diğer gen etkileşimleri

Transkobalamin, cistationin beta sentaz, metionin sentaz redüktaz ve metionin sentaz'ın MTHFR alleleri ile kombinasyonları araştırılmıştır. MTHFR ve transkobalamin

genlerindeki polimorfizmler, spontan abortlar için riski arttırabilen homosistein metabolizmasını etkilemektedir. C677T ve Sistationin beta sentaz 844ins68 polimorfizmlerine sahip bireylerde spina bifida riskinin arttırdığı gösterilmiştir. Metionin sentaz redüktaz (A66G) ve MTHFR C677T polimorfizmleri için homozigot olan bireylerde spina bifida için riskin arttığı gösterilmiştir. MTHFR C677T, T alleli ile metionin sentaz A2756G, G alleli birlikte bulunduğu kolorektal kanser riskini azalttığı ve korunmada belli derecelerde etkili olabileceği ifade edilmiştir (80).

Özet olarak;

Vücuttaki homosistein, transsülfürasyon veya remetilasyon yollarından birini kullanarak metabolize olmaktadır. Remetilasyon yolunda, 5,10- metilentetrahidrofolat MTHFR aracılığı ile 5-metiltetrahidrofolata dönüşmektedir. 5-metiltetrahidrofolatın bir metil gurubu metioninsentaz aracılığı ile homosisteine aktarılarak metionin oluşturulmakta ve tetrahidrofolat meydana gelmektedir. Tetrahidrofolat yeniden 5-10 metilentetrahidrofolata dönüşmektedir. Dolayısıyla, homosistein metabolizmasındaki bir yolun bozulması diğer metabolik yollarında bozulmasına sebep olmaktadır (88).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Araç ve Gereçler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, cihazlar, teknik malzemeler ve temin edildikleri firmalar aşağıda belirtilmiştir.

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

- § Taq DNA polimeraz enzimi (BioLabs)
- § Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tamponu (BioLabs)
- § Primerler
- § dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Sigma)
- § Restriksiyon enzimleri Hinf I ve Fnu4HI (BioLabs)
- § Homosistein Kiti (SunRed Human (HCY) Elisa Kit)
- § Folik Asit Kiti (Beckman Coulter BX1800Kemilüminisans Test Kitleri)
- § Etidiyum bromid (Sigma)
- § Agaroz (Sigma)
- § Tris-baz (Sigma)
- § Borik asit (Sigma)
- § Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) (Sigma)
- § Sodyum klorür (NaCl) (Merck)
- § Bromfenol mavisi (Merck)
- § Magnezyum Klorür
- § Tris-HCl
- § TritonX100 (Sigma)
- § Süktroz (Merck)
- § Proteinaz-K (Sigma)
- § Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma)
- § Etil alkol (Merck)
- § Distile ve bidistile su

3.1.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler

- § Soğutmalı santrifüj (Universal 16R)
- § Mikrosantrifüj (Techne force 16)

- § Su banyoları (Grant)
- § Hassas Terazı (Sartorius)
- § Terazı (Shimadzu 321-33557)
- § pH metre (İnolab)
- § UV jel görüntüleme sistemi (UVI tec)
- § Otomatik pipetler (Gilson, Brand)
- § Vorteks (Nüve NM 110)
- § Etüv (Dedeoğlu)
- § Elektroforez güç kaynağı (EC3000-90)
- § Yatay elektroforez sistemi (Biogen)
- § Dikey elektroforez sistemi (Biolab)
- § PZR cihazı (Thermal cycler Ependorf Mastercycler)
- § Nanodrop (IMPLEN) (Spektrofotometre)
- § Buzdolabı (Arçelik)
- § Derin Dondurucu (Siemens, Bosch)
- § Otoklav (Trans)

3.2 Kan Örneklerinin Sağlanması

Çalışma grupları Down Sendromu tanısı almış çocukların annelerinden ve herhangi bir hastalık tanısı almamış normal çocuk sahibi annelerden oluşturuldu. Down sendromu ya da herhangi bir sendrom şüphesiyle küretaj geçmişi bulunan anneler kontrol grubuna dahil edilmedi. Hasta grubu (n=67) D1, D2, D3 olarak, kontrol grubu (n=66) K1, K2, K3 olarak kodlandırıldı.

Bu kişilerden DNA izolasyonu için EDTA' lı tüpe, folat-homosistein değerlerinin tespiti için biyokimya tüpüne kan alındı. Tüpler alt üst edilerek kanların pıhtılaşması önleni ve EDTA'li tüplere alınan kan örnekleri DNA izolasyonunda kullanıldı. Biyokimya tüplerine alınan kan örneklerinin serumları ayrılarak, folat ve homosistein değerlerinin belirlenmesinde kullanıldı.

3.2.1. Hasta Rızası

Bu çalışmada yer alan tüm hastaların Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulları Araştırma Projesi Bilgi ve Taahhüt Formunda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmış Onam Formlarını doldurmaları sağlandı.

3.3. Yöntem

3.3.1. Homosistein ve Folat Ölçümü

Hasta ve kontrol gruplarından alınmış olan kanlar 3500 devirde 4 dakika santrifüj edildikten sonra serumları ayrıldı. Serumlar, folat ve homosistein değerlerinin belirlenmesi için analiz yapılınca kadar -20°C’ de bekletildi. Folat değerleri Beckman Coulter BX1800 cihazı kullanılarak kemilüminisans test kiti ve homosistein değerleri SunRed Human (HCY) ElisaKit kullanılarak Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarı’ nda ölçüldü.

3.3.2. Periferik Kandan DNA Eldesi

Biyolojik örneklerden genomik DNA’ nın izolasyonu moleküler tanı yöntemlerinin uygulanmasında gerekli ilk adımdır.

Periferik kandan DNA eldesi için Miller ve arkadaşlarının geliştirdiği salting out (tuzla çöktürme) yöntemi modifiye edilerek uygulandı.

1. 1,5 ml lik ependorf tüp içerisine iyice alt üst edilmiş kan örneğinden 700 µl, eritrosit lizis (Ek-1.1) solüsyonundan da 700µl konulup dikkatlice alt üst edilerek 3-5 dk. oda ısısında bekletildi. 4500 rpm.de 5 dk. santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı atıldı.
2. Elde edilen pellet üzerine 700µl eritrosit lizis solüsyonu eklendi. Tüp kuvvetlice çalkalanarak pellet çözündürüldü. 4500 rpm.de 5 dk. santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı atıldı.
3. Pellet üzerine 1000 µl (1ml) fizyolojik tampon (Ek-1.2) eklenerek çözündürüldü. 4500 rpm.de 5 dk. santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı atıldı.
4. Pellet üzerine 300 µl TE-9 (Ek-1.3) tamponu ilave edilerek çözündürüldü. Bunun üzerine 100 µl SDS (Ek-1.4) ile 20 µl Proteinaz-K (Ek-1.5) ilave edildi. Vorteks üzerinde tüp içeriği iyice karıştırıldı. 1-2 saat 65 °C de benmaride tutuldu. 20 dk aralıklarla tüp alt üst edildi.
5. İnkübasyon sonunda tüp içersine 200 µl 6M NaCl (Ek-1.6) ilave edildi. Oluşan beyaz görünümlü yapıyı dağıtmak için tüp kuvvetlice çalkalanıp 13500 rpm.de 7 dk. santrifüj edildi.

6. Santrifüj sonunda süpernatant başka bir tüpe alınıp pellet atıldı. Süpernatant tekrar 13500 rpm.de 7 dk. santrifüj edildi.
7. Yine süpernatant başka bir tüpe alınıp pellet atıldı. Tuzdan arınmış olan süpernatantın üzerine 900 µl %100' lük etil alkol eklendi. Tüp iyice karıştırıldı. Bu aşamada DNA ipliksi yapıda görülebilmektedir.
8. Tüp içeriği 13500 rpm.de 7 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
9. Tüpün dibine yapışan DNA' yı kaldırmak için 1000 µl %70' lik etil alkol (Ek-1.7) eklendi. 13500 rpm.de 7 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Bu işlem bir kez daha tekrar edildi.
10. Süpernatant döküldükten sonra tüp ters çevrilip DNA' nın tüpe yapışması ve alkolün uçması için 15 dk. beklendi.
11. DNA' nın büyüklüğüne göre 50-100 µl TE (Tris-EDTA) (Ek-1.8) konuldu.
12. DNaz aktivitesini ortadan kaldırmak için 70-80 °C de benmaride 10-15 dk. inkübasyona bırakıldı.
13. DNA örnekleri kullanılıncaya kadar +4 °C de muhafaza edildi. Uzun süreli saklamak için ise -20 °C ye alındı.

3.3.3. DNA Konsantrasyonun ve Saflık Derecesinin Ölçülmesi

DNA konsantrasyonu ve saflık derecesini belirlemek için UV (ultraviyole) spektrofotometresi kullanılır. DNA 'nın içinde bulunduğu solüsyon tarafından absorbe edilen UV miktarı, örnekteki DNA miktarı ile paraleldir. Absorbans genellikle 260 nm dalga boyunda ölçülür. Bu dalga boyundaki ölçümlerde çift iplikli DNA için absorbans değeri 50µg/ml, tek iplikli DNA (ssDNA) için 33 µg/ml, RNA için ise 40 µg/ml'dir.

UV absorbansı DNA saflığının belirlenmesinde de kullanılır. 260nm' de nükleik asitler, 280nm ' de proteinler pik verir. Saf bir DNA örneğinde 260 ve 280 nm' de ki absorbans değeri $A_{260}/A_{280}=1.8$ ' dir. Bu değer sahip olduğumuz DNA'nın saflığını gösterir. 1.8' den düşük değerler; fenol ve protein kontaminasyonu, 1.8'den büyük değerler ise RNA kontaminasyonu varlığını gösterir (Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T Molecular cloning. A laboratory Manuel 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor,1989.)

3.3.4. Agaroz Jelin Hazırlanması

PZR sonrasında elde edilen ürünlerin varlığını kontrol etmek için kolay ve hızlı hazırlanması sebebi ile agaroz jellerden yararlanıldı. Genellikle %2 oranında agaroz jel hazırlandı.

1. Çalışmaya başlamadan önce jel kabı iyice temizlenip kurutulduktan sonra jel dökme kalıbına yerleştirildi. Bu kalıp düzgün bir yüzeye kondu. Kuyucuk oluşturmak için kullanılan taraklar düzgünce yerlerine yerleştirildi.
2. Jel dökme kabının boyutları ve jelin kalınlığı dikkate alınarak hesaplama yapıldı. 8x9 cm boyutundaki jel kabına %2 konsantrasyonunda jel dökmek için erlenmayerde 1gr agaroz tartılıp, 50 ml 1 x TBE solüsyonu (Ek-2.1) mikrodalga fırın içinde agaroz iyice eriyinceye kadar ısıtıldı.
3. Jelin içine 3 µl stok EtBr (Etidiyum Bromür) solüsyonundan (Ek-2.2) ilave edildi.
4. Agaroz çözeltisi, sıcaklığı 45-50 °C'ye (el yakmayacak sıcaklığa) gelinceye kadar soğutuldu.
5. Ilık agaroz çözeltisi hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek jel kabına döküldü.
6. Jelin oda sıcaklığında yaklaşık 30-45 dk. polimerize olması için beklendi.
7. Jel elektroforez tankına alındı, üzerini örtecek kadar 1 x TBE tamponu ilave edildi. Taraklar dikkatlice çekilerek, yükleme yapılacak kuyuların oluşması ile jel hazır hale getirildi.

3.3.5. Örneklerin Agaroz Jele Yüklmesi ve Yürütülmesi

Kontrol edilmek istenen DNA örnekleri jel yükleme tamponu (Loading dye) (Ek-2.3) ile birlikte yüklendi.

Jel Yükleme (veya DNA yükleme) Tamponu

- § Örneğin yoğunluğunu arttırarak DNA' nın kuyucuğa düzgün olarak damlamasını sağlar.
- § Örneği renklendirerek kuyulara yüklenme işlemini basitleştirir.
- § Elektriksel alanda göç hareketinin takip edilmesini kolaylaştırır. Jelin sağındaki veya solundaki ilk kuyuya moleküler ağırlığı bilinen marker

DNA'dan 5 µl yüklendi. Mikropipet ile 5 µl PZR ürünü ile 1 µl Bromfenol mavisi içeren 6X yükleme tamponu karıştırıldı. Toplamı 6 µl olan karışım kuyucuklara yüklendi. 100 voltta 60 dakika elektrik akımına maruz bırakılarak yürütüldü.

- § Jel UVI doc cihazında ultraviyole ışık altında görüntülendi ve jel görüntüleri diskete kaydedildi.

3.3.6. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yönteminin Uygulanması

PZR, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'daki dizisi bilinen herhangi bir bölgenin çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan basit ama çok başarılı bir in vitro DNA sentez yöntemidir.

PZR reaksiyonunun hazırlanmasında temel olarak sırasıyla şu basamaklar izlendi.

- § PZR mixinde kullanılacak çözelti ve DNA miktarları için gerekli hesaplamalar yapıldı.
- § Reaksiyonda kullanılacak DNA'lar ve çözeltiler -20 °C'den alınıp çözündürüldü.
- § 200 µl'lik PCR tüpleri üzerine örnek kodu yazılarak hazırlandı.
- § Tüm DNA örnekleri ve çözeltiler önce vortekslendi, daha sonra tüpün duvarındaki tüm damlaları toplamak amacıyla kısa bir süre santrifüj edildi.
- § Reaksiyon hacmini tamamlamak için steril su kullanıldı.
- § PZR mixi hazırlamak için 200 µl lik PCR tüpüne hesaplanan miktarlarda PZR tamponu, forward ve reverse primerler, dNTP mix ve Taq polimeraz eklendi.
- § Kısa bir vorteks ve santrifüj yapıldı.
- § Kodlanmış her bir PZR tüpüne hesap edilen miktarlarda su ve kodunu taşıdıkları DNA eklendi.
- § PZR mixi tüplere eşit olarak dağıtıldı.
- § Tüplerin her biri önce vortekslenip sonra santrifüj edildi.
- § Daha sonra önceden programlanmış termal cykler'a yerleştirildi ve cihaz çalıştırıldı.

3.3.6.1. MTHFR Geni A1298C Polimorfizmi için PZR Yönteminin Uygulanması

Çalışmamızda MTHFR (Metilentetrahidrofolat Redüktaz Geni (Gen ID: 4524))'nin 7. ekzon bölgesini çoğaltmak için 21 ve 19 baz çifti uzunluğundaki primer dizileri belirlendi. Seçilen primer dizileri aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. MTHFR geni 1298 polimorfizmi için ekzon 7 bölgesinin amplifikasyonu için gerekli primer çiftleri

Primer Forward	5'-GGG AGG AGC TGA CCA GTG CAG-3'	21 baz çifti
Primer Reverse	5'- GGG GTC AGG CCA GGG GCA G-3'	19 baz çifti



Şekil 5. MTHFR geni 1298 A>C polimorfizmi için PZR ile çoğaltılan 138 baz çiftlik bölge.

Örneklerimizin uygun amplifikasyon koşullarını saptamak için çeşitli denemeler yapıldı. Primerlerin, Taq polimerazın, dNTP'nin farklı konsantrasyonları ile PZR programında farklı ısı döngüleri ve annealing (yapışma) ısıları denendi; her denemede sadece bir değişken dışındakiler sabit tutuldu. Optimal amplifikasyonun gerçekleştiği koşullar bütün PZR reaksiyonları için kullanıldı.

PZR reaksiyonunu gerçekleştirmek için kullanılan malzemelerin tümü ticari olarak satın alınmıştır. Amplifiye olan ürünler ileri ki çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C de saklandı.

Çizelge 2. MTHFR geni ekzon 7 bölgesinin optimal amplifikasyonlarının gerçekleşmesinde kullanılan maddeler ve miktarları

Reaksiyon Karışımı	Kullanılan Miktar (µl)	Final Konsantrasyonu
10 x PZR Tamponu	2,5 µl	1x PZR Tamponu
dNTP	0,2 µl	25 mM
Primer F	0,4 µl	10 pmol
Primer R	0,4 µl	10 pmol
Taq Polimeraz Enzimi	1 µl	0,05 U/ µl
MgCl ₂	1,5 µl	
Genomik DNA (1/10) sulandırılmış	2 µl	100-200 ng
Bidistile su	17 µl	
Toplam hacim	25 µl	

Çizelge 3. MTHFR geni ekzon 7 bölgesinin optimal amplifikasyonlarının gerçekleştiği PZR programı ısı döngüleri

Döngüler	Sıcaklık	Süre
1.Ön Denatürasyon	95.0 °C	3 dk
2.Denatürasyon	95.0 °C	45 sn
3.Yapışma (Annealing)	62.0 °C	30 sn
4.Sentez (Extension)	72.0 °C	30 sn
5.Toplam Döngü Sayısı (2. Döngüden itibaren)	30	
6.Final Uzama	72 °C	5 dk
7.Saklama	4 °C	Uzun süre

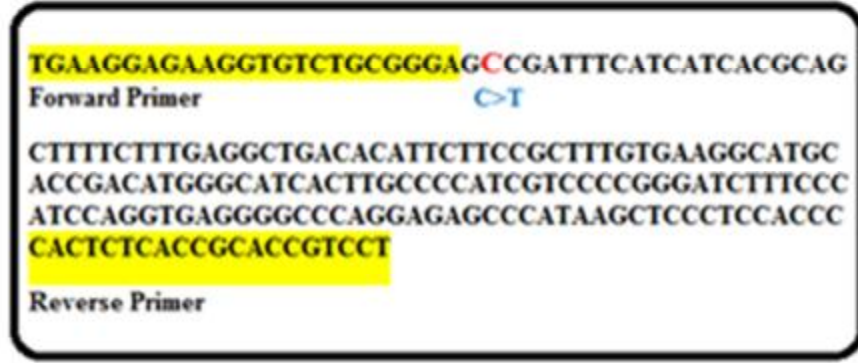
Örneklerin amplifikasyonu ve elde edilen bantların kontrolü 3.3.5' te anlatıldığı gibi %2' lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

3.3.6.2. MTHFR Geni C677T Polimorfizmi için PZR Yönteminin Uygulanması

Çalışmamızda MTHFR geni ekzon 4 bölgesini çoğaltmak için belirlenmiş olan primer dizileri aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 4).

Çizelge 4. MTHFR geni 677 polimorfizmi için ekzon 4 bölgesinin amplifikasyonu için gerekli primer çiftleri

Primer Forward	5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3'	23 baz çifti
Primer Reverse	5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'	20 baz çifti



Şekil 6. MTHFR geni 677 C>T polimorfizmi için PZR ile çoğaltılan 198 baz çiftlik bölge.

Örneklerimizin uygun amplifikasyon koşullarını saptamak için çeşitli denemeler yapıldı. Primerlerin, Taq polimerazın, dNTP'nin farklı konsantrasyonları ile PZR programında farklı ısı döngüleri ve annealing (yapışma ısıları) denendi; her denemede sadece bir değişken dışındakiler sabit tutuldu. Optimal amplifikasyon 2 farklı annealing ısılarının kullanıldığı touchdown PZR ile elde edildi ve bu koşullar bütün PZR reaksiyonları için uygulandı.

Amplifiye olan ürünler ileri ki çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C de saklandı.

Çizelge 5. MTHFR geni 677 C>T polimorfizmi için optimal amplifikasyonlarının gerçekleşmesinde kullanılan PCR reaksiyon koşulları.

Reaksiyon Karışımı	Kullanılan Miktar (µl)	Final Konsantrasyonu
10 x PCR Tamponu	2,5 µl	1x PZR Tamponu
dNTP	0,2 µl	25 mM
Primer F	0,4 µl	10 pmol
Primer R	0,4 µl	10 pmol
MgCl ₂	1,5 µl	
Taq Polimeraz Enzimi	0,6 µl	0,05 U/ µl
Genomik DNA (1/10) sulandırılmış	2 µl	100-200 ng
Bidistile su	17,4 µl	
Toplam hacim	25 µl	

Çizelge 6. MTHFR geni 677 C>T polimorfizmi için optimal amplifikasyonlarının gerçekleştiği PZR programı ısı döngüleri.

Döngüler	Sıcaklık	Süre
1.Ön Denatürasyon	94.0 °C	2 dk
2.Denatürasyon	94.0 °C	30 sn
3.Yapışma (Annealing)	62.0 °C	30 sn
4.Sentez (Extension)	72.0 °C	30 sn
5.Toplam Döngü Sayısı (2. Döngüden itibaren)	40	
6.Final Uzama	72 °C	7 dk
7.Saklama	4 °C	Uzun süre

Örneklerin amplifikasyonu ve elde edilen bantların kontrolü 3.3.3' te anlatıldığı gibi %2' lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

3.3.7. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP Restriction Length Fragment Polymorphism) Yönteminin Uygulanması

Agaroz jel elektorforeziyle MTHFR geni A1298C ve C677T polimorfizleri için amplifikasyon kontrolü yapılan örnekler kesim reaksiyonuna alındı. C677T

polimorfizmi için *HinfI*, A1298C polimorfizmi için *Fnu4HI* restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. Bu enzimlerin kesim bölgeleri aşağıdaki gibidir.



Kesim reaksiyonları için aşağıda belirlenen oranlarda reaksiyon bileşenleri hazırlandı.

Çizelge 7. MTHFR geni 1298 ve 677 polimorfizmleri için RFLP reaksiyon koşulları.

Reaksiyon Karışımı	Kullanılan Miktar (µl)
Tampon	2,5 µl
Restriksiyon Enzimi	0,5µl
Amplifiye ürün (PCR ürünü)	10 µl
Steril Bidistile su	7 µl
Toplam Hacim	20 µl
Reaksiyon Isısı	37 °C
Reaksiyon Süresi	17 saat

Çizelge 8. MTHFR geni 1298 ve 677 polimorfizmleri için RFLP reaksiyonu ısı döngüleri.

Döngüler	Sıcaklık	Süre
1.Kesim reaksiyonu	37 °C	17 saat
2.Enzim İnaktivasyonu	- 20 °C	1 saat

Amplifiye olmuş örneklerin kesim reaksiyonu *Fnu4HI* ve *Hinf I* restriksiyon endonükleazlar ile yukarıda belirlenen ısı döngülerine göre gerçekleştirildi.

Enzim inaktivasyonundan sonra kesim ürünleri Bromfenol mavisi içeren 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak agaroz ve poliakrilamid jellere uygulamaya hazır hale getirildi. Bunun için 6X yükleme tamponundan 1 µl alınıp 5 µl kesim ürünü ile karıştırıldı.

3.3.8. İstatiksel Analiz

İstatistik analizler SPSS 11.5 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasında genotip ve allel frekanslarının karşılaştırmalarında “Ki Kare (χ^2) Testi”, folat ve homosistein değerlerinin karşılaştırılmasında “Student t Testi” ve “Mann Whitney U” testi kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.



4. BULGULAR

Yaptığımız çalışmada 67 down sendromlu çocuk sahibi anne ve 66 sağlıklı çocuk sahibi anneden alınan DNA örneklerinde Metilentetrahidrofolat Redüktaz Geni 1298 A>C polimorfizmi ve 677 C>T polimorfizmlerinin genotip dağılımları araştırıldı. Çalışmaya dahil edilen tüm annelerde homosistein ve folat değerleri ölçüldü. Tüm annelerden alınan kanlardan elde edilen DNA örnekleri PCR–RFLP yöntemi kullanılarak, araştırılan polimorfizmlerin genotip dağılımları belirlendi ve elde edilen verilerden istatistiksel analiz yapıldı.

4.1. Biyokimyasal Bulgular

21. kromozomdan üç kopya bulunan karyotip görüntüsüne sahip çocukların annelerinden oluşan hasta grubu ve sağlıklı çocuk sahibi olan, herhangi bir anomali sebebi ile küretaj öyküsü bulunmayan annelerden oluşan kontrol grubu bireylerden alınan kanlardan elde edilen serum içeriği homosistein ve folat ölçümü için kullanıldı. Metilentetrahidrofolat redüktaz, folat metabolizmasında yer alan enzimlerin en önemlilerinden biri olduğu için, MTHFR geninde incelediğimiz mutasyonların serum folat ve homosistein değerleri ile ilişkili olup olmadığını tesbit etmek için hasta ve kontrol grubumuzu oluşturan annelere homosistein ölçümü (nmol/mL) yaptık ve istatistiksel olarak değerlendirdik. Folat düzeyi de, vitamin B₁₂ ve vitamin B₆ eksikliği sonucu hiperhomosisteinemiye sebep olduğu bilindiğinden yine çalışma grubumuzu oluşturan tüm annelerden folat ölçümü (ng/mL) yapıldı ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

Hasta ve kontrol grubuna ait folat ve homosistein değerlerinin ortalamaları alındı. Sağlıklı kontrol grubu ile down sendromlu çocuk sahibi annelerden oluşan gruba ait biyokimyasal bulguların karşılaştırılmasında student t-testi ve Mann Whitney U testi uygulandı. Analiz sonuçlarına göre gruplar arasında klinik bulgular açısından istatistiksel olarak farklılık olduğu saptandı ($p<0.05$). Çizelge 14’ te gösterildiği gibi, down sendromlu çocuk sahibi olma ile 1298 ve 677. bölgelerdeki tek nükleotid polimorfizmleri ve homosistein, folat verileri açısından karşılaştırma yapıldı. Buna göre 1298 AA genotipi açısından, homosistein ve folat değerleri, hasta ve kontrol grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu ($p<0.05$). Hasta grubunun

1298AA genotipli bireylerinde folat değerleri ortalaması diğer genotiplere göre daha düşük bulunurken, kontrol grubundaki 1298AA genotipli bireylerde ise diğer genotiplere göre daha yüksek bulunmuştur. Homosistein değerlerinde de benzer sonuçlar gözlenmiştir. 677 CT ve 677 TT genotipleri açısından, hasta ve kontrol grubu folat değerleri kıyaslandığında yine istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edildi ($p<0.05$).

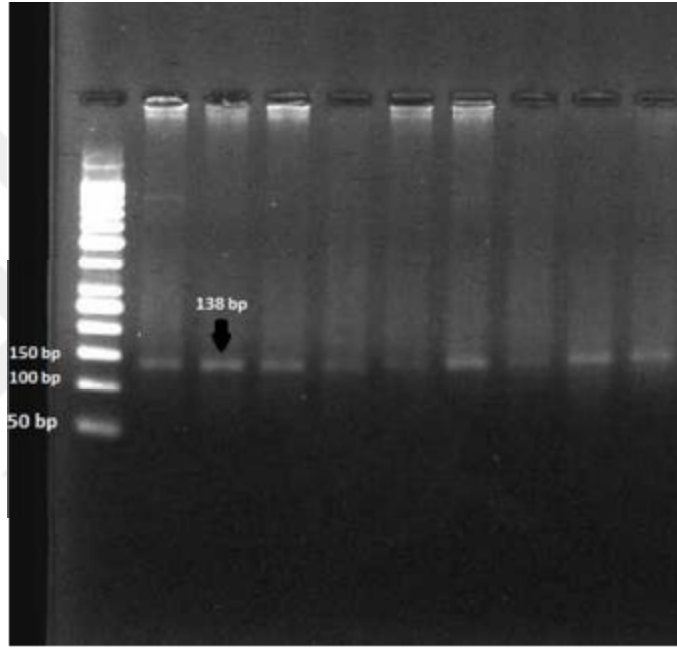
Çizelge 9. Down sendromlu çocuk sahibi annelerin ve sağlıklı çocuk sahibi annelerin homosistein ve folat değerlerinin ortalama, standart hata ve p değerleri

	FOLAT (Ortalama±Standart Hata)			HOMOSİSTEİN (Ortalama±Standart Hata)		
	Down sendromlu çocuk sahibi anneler	Sağlıklı çocuk sahibi anneler	P değeri	Down sendromlu çocuk sahibi anneler	Sağlıklı çocuk sahibi anneler	P değeri
Genel karşılaştırma	6.05±0.29	7.85±0.52	p<0.05	13.46±0.95	18.14±1.64	p<0.05
1298						
AA	5.63±0.44	8.58±0.68	p<0.05	11.24±0.68	18.45±2.35	p<0.05
AC	6.91±0.55	7.27±0.85	p>0.05	12.99±0.89	18.30±2.53	P<0.05
CC	8.58±2.21	7.68±1.40		23.80±6.11	18.29±10.68	
677						
CC						
CT	6.23±0.36	9.08±1.65	p<0.05	14.30±1.15	18.06±3.23	p>0.05
TT	6.25±0.71	8.01±0.46	p<0.05	20.25±6.55	15.53±3.17	p>0.05

4.2. Moleküler Bulgular

4.2.1 MTHFR Geni 1298 A>C Polimorfizmi İçin Moleküler Genetik Bulgular

MTHFR geni 1298 bölgesinin 138 baz çiftlik kısmı PZR yöntemi ile çoğaltıldı ve % 2' lik agaroz jelde yürütüldü. Çalışılan hasta ve kontrollerden bazılarının PZR yöntemi ile çoğaltılmış MTHFR geni ekson 7 bölgesindeki 138 baz çifti uzunluğundaki bant görüntüleri şekil 7' de gösterilmiştir.



Şekil 7. Hasta gruba ait bazı örneklerin, MTHFR geni ekson 7 bölgesinde ki 138 bç. uzunluğunda ki bölgenin PZR yöntemi ile çoğaltılıp agaroz jelde yürütüldükten sonra oluşturdukları bant görüntüleri. M: Markır DNA, Bantlar 138 bp. büyüklüğündedir.

MTHFR geninin 1298 polimorfizmini içeren 138 bç.' lik bölgesi PZR yöntemi kullanılarak çoğaltıldıktan sonra RFLP yöntemi kullanılarak *Fnu4HI* restriksiyon enzimi ile kesildi. Kesim reaksiyonu sonucunda adeninden → sitozine (A>C) nükleotit değişimi olmayan homozigot bireylerde (AA genotipli) 138 bç' lik tek bant, tek allelinde nükleotit değişimi olan heterozigot bireylerde (AC genotipli) 138, 119, 19 bç' lik üç bant, her iki allelinde nükleotit değişimi görülen bireylerde de (CC genotipli) 119, 19 bç' lik 2 bant görülmüştür

Çalışmamızda yer alan 67 down sendromlu çocuk sahibi kadının MTHFR geni A1298C polimorfizmi açısından RFLP yöntemi ile analizi sonucunda 19' unun AC, 29'

nun AA, 17'nin CC genotipine sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışılan hastalardan iki tanesinden ise sonuç elde edilememiştir. Çalışmamızda 66 sağlıklı çocuk sahibi annelerden oluşan kontrol grubunun ise 24'nün AC, 33'nün AA, 7' nin CC genotipine sahip olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubunda iki bireyden sonuç elde edilememiştir. Hasta ve kontrol grubuna ait bireylerin genotipleri çizelge 10 'da verilmiştir.

Çizelge 10. Down Sendromlu çocuğu olan annelerden oluşan hasta grubu ve sağlıklı çocuğu olan kontrol grubu annelerin MTHFR geni 1298 bölgesi için Fnu4HI enzimi ile kesimi sonucunda elde edilen genotip kodları

Hasta No	MTHFR 1298	Hasta No	MTHFR 1298	Hasta-Kontrol	MTHFR 1298	Kontrol No	MTHFR 1298	Kontrol No	MTHFR 1298	Kontrol No	MTHFR 1298
D1	AA	D26	AC	D51	AC	K1	AA	K26	AC	K51	CC
D2	AA	D27	CC	D52		K2	CC	K27	AA	K52	AA
D3	CC	D28	CC	D53	AA	K3	AC	K28	AA	K53	AA
D4	AA	D29	CC	D54	CC	K4	AA	K29	CC	K54	AA
D5	AA	D30	CC	D55		K5	CC	K30	AA	K55	AC
D6	AA	D31	AA	D56	CC	K6	AA	K31	AC	K56	AA
D7	AC	D32	AA	D57	AA	K7	AC	K32	AC	K57	CC
D8	AC	D33	CC	D58	AA	K8	AA	K33	AC	K58	AA
D9	CC	D34	AA	D59	CC	K9	CC	K34	AA	K59	AA
D10	AA	D35	AA	D60	AA	K10	AA	K35	AC	K60	AA
D11	AA	D36	CC	D61	AA	K11	AC	K36	AA	K61	AA
D12	AC	D37	AA	D62	AA	K12	AA	K37	AC	K62	AC
D13	AC	D38	CC	D63	CC	K13	AA	K38	AC	K63	AC
D14	AC	D39	AA	D64	AA	K14	AA	K39	AA	K64	AC
D15	AC	D40	AC	D65	AA	K15	AC	K40	AC		
D16	CC	D41	AC	D66	AA	K16	AC	K41	AA		
D17	AC	D42	AA	D67	AA	K17	AA	K42	AC		
D18	CC	D43	AC			K18	AA	K43	AA		
D19	CC	D44	AA			K19	AC	K44	AA		
D20	AC	D45	AC			K20	CC	K45	AC		
D21	AA	D46	AC			K21	AA	K46	AA		
D22	AA	D47	AA			K22	AA	K47	AA		
D23	AC	D48	AC			K23	AC	K48	AA		
D24	CC	D49	AA			K24	AC	K49	AA		
D25	AC	D50	AC			K25	AC	K50	AC		

MTHFR geni A1298C polimorfizminin genotip dağılımları ve allel frekansları Ki kare (χ^2) testi kullanılarak analiz edilmiştir. (Çizelge 11-12). Hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Aynı şekilde AC ve CC genotipleri AA genotipine karşı birlikte değerlendirildiğinde, hasta grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Allel frekansları karşılaştırıldığında, her iki grup arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Hasta ve kontrol grupları arasında CC genotiplerine ait oransal değerlendirme yapıldığında, hasta grubundaki genotip frekansı oranının kontrol grubundan daha yüksek olduğu ve bu farkın istatistiki olarak önemli bulunduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Benzer şekilde allel frekanslarının genel karşılaştırmasında hasta ve kontrol grupları arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Fakat “C” allel frekansı oranı hasta grubunda(%40.8) kontrol grubuna(%29.7) göre daha yüksektir ve oranlar arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). “A” allel frekansı oranı kontrol grubunda (%70.3) hasta grubuna (%59.2) göre daha yüksek bulunmuştur ve iki gruptaki bu oransal fark istatistiki olarak önemlidir ($p<0.05$).

Çizelge 11. MTHFR geni 1298 bölgesi için down sendromlu çocuk sahibi annelerden oluşan hasta ve sağlıklı çocuk sahibi annelerden oluşan kontrol gruplarına ait genotip frekansları (n: birey sayısı)

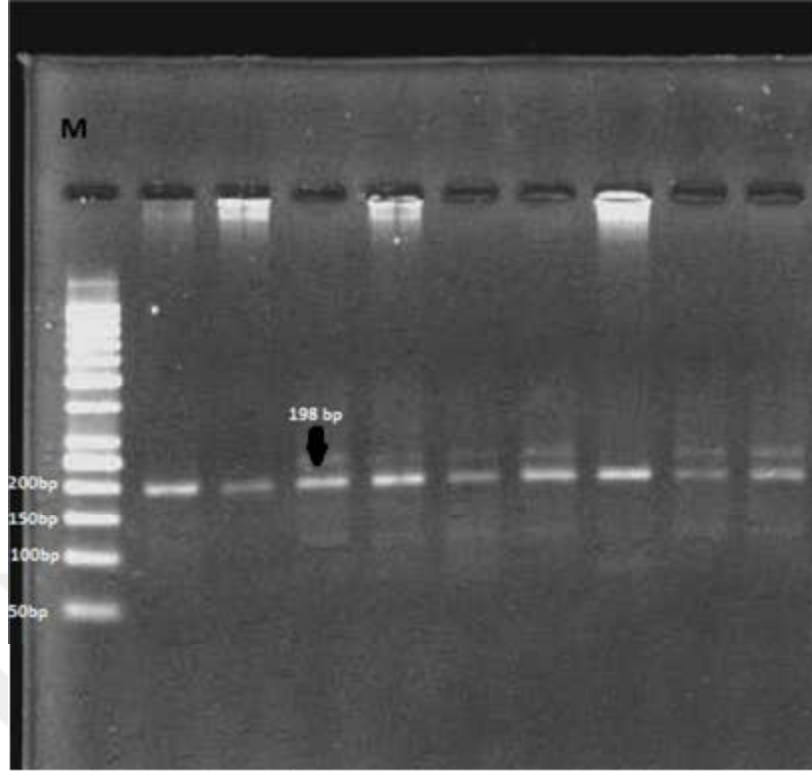
	Genotip Frekansları			
	AA	CC	AC	AC+CC
	n %	n %	n %	n %
Down sendromlu çocuk sahibi anneler (n:65)	29 44.6	17 26.2	19 29.2	36 55.3
Sağlıklı çocuk sahibi anneler (n:64)	33 51.6	7 10.9	24 37.5	31 48.4
χ^2 Testi	4.99			0.623
OR(%95CI) Odd Değeri (%95 Güven Aralığı)	1	0.362 (0.132-0.995)	1.11 (0.508-2.426)	

Çizelge 12. MTHFR geni 1298 bölgesi için down sendromlu çocuk sahibi annelerden oluşan hasta ve sağlıklı çocuk sahibi annelerden oluşan kontrol gruplarına ait allel frekansları (n: birey sayısı)

	Allel Frekansları	
	A	C
	n	n
	%	%
Down sendromlu çocuk sahibi anneler (n:65)	77 59.2	53 40.8
Sağlıklı çocuk sahibi anneler (n:64)	90 70.3	38 29.7
χ^2 Testi	3.469	
OR(%95Cl) Odd Değeri (%95 Güven Aralığı)	1	0.613 (0.37-1.03)

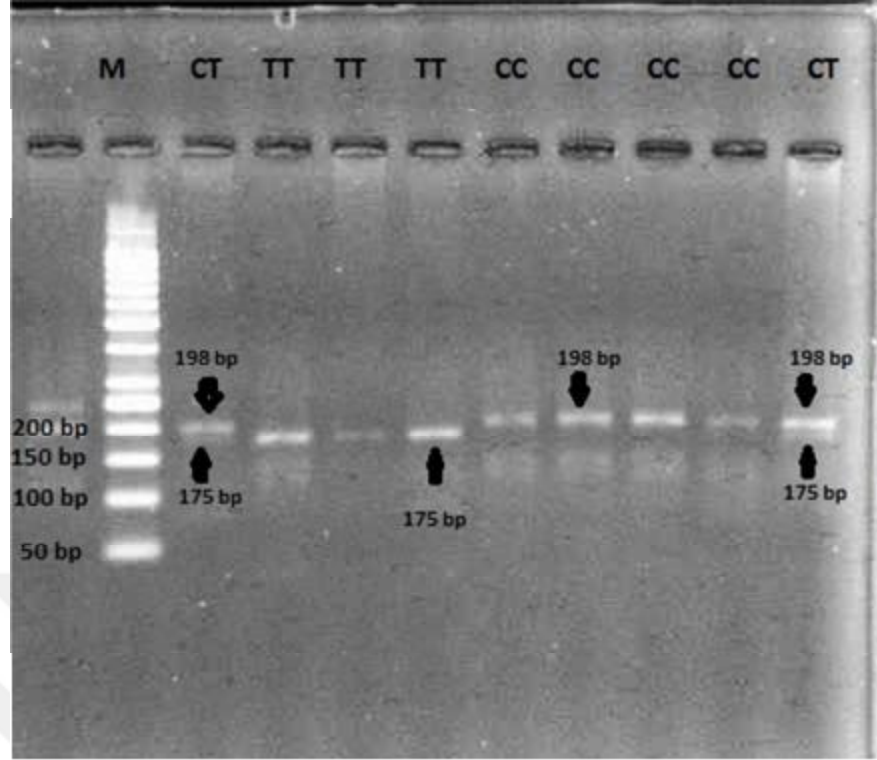
4.2.2. MTHFR Geni 677 C>T Polimorfizmi İçin Moleküler Genetik Bulgular

MTHFR geni 677 bölgesini içeren 198 baz çiftlik kısmı PZR yöntemi ile çoğaltıldı ve % 2' lik agaroz jelde yürütüldü. Çalışılan hasta ve kontrollerden bazılarının PZR yöntemi ile çoğaltılmış MTHFR geni 677 bölgesine ait 198 baz çifti uzunluğunda ki bölgenin bant görüntüleri Şekil 8' de gösterilmiştir.



Şekil 8. Hasta gruba ait bazı örneklerin, MTHFR geni 677 bölgesini içeren 198 baz çifti uzunluğundaki bölgenin PZR yöntemi ile çoğaltılıp agaroz jelde yürütüldükten sonra oluşturdukları bant görüntüleri. M: Markır DNA.

MTHFR geni 677 bölgesine ait 198 bç.' lik bölge PZR yöntemi kullanılarak çoğaltıldıktan sonra RFLP yöntemi kullanılarak *HinfI* restriksiyon enzimi ile kesildi. Kesim reaksiyonu sonucunda sitozin → timin (C>T) nükleotit değişimi olmayan homozigot bireylerde (CC genotipli) 198 bç.' lik tek bant, tek allelinde nükleotit değişimi olan heterozigot bireylerde (CT genotipli) 198, 175, 23 bç.' lik üç bant, her iki allelinde nükleotit değişimi görülen bireylerde de (TT genotipli) 175, 23 bç.' lik iki bant oluşmuştur. Ancak CT ve TT genotipli bireylerde görülmesi beklenen 23 bç.'lik bant, çok küçük olmasından dolayı, agaroz jel görüntüsünde görülememiştir (Şekil 9)



Şekil 9. Hasta ve kontrol gruplarına ait bazı örneklerin RFLP yöntemi ile (Hinf I enzimi ile) kesilip, agaroz jelde yürütüldükten sonra oluşturdukları bant görüntüleri. M: Markır DNA, CC, CT, TT: genotipler.

Çalışmamızda yer alan 67 down sendromlu çocuk sahibi kadının MTHFR geni C677T polimorfizmi açısından RFLP yöntemi ile analizi sonucunda 6' sının CC, 50' nin CT, 11'inin TT genotipine sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda 66 sağlıklı çocuk sahibi annelerden oluşan kontrol grubunun ise 28'inin CC, 27' inin CT, 11'nin TT genotipine sahip olduğu belirlenmiştir. Hasta ve kontrol grubuna ait bireylerin genotipleri çizelge 13 ' de verilmiştir.

Çizelge 13. Down Sendromlu çocuğı olan annelerden oluşan hasta grubu ve sağılıklı çocuğı olan kontrol grubu annelerin MTHFR geni 677 bölgesi için Hinf I enzimi ile kesimi sonucunda elde edilen genotip kodları

Hasta No	MTHFR 677	Hasta No	MTHFR 677	Hasta-Kontrol	MTHFR 677	Kontrol No	MTHFR 677	Kontrol No	MTHFR 677	Kontrol No	MTHFR 677
D1	TT	D26	CT	D51	CT	K1	CT	K26	CT	K51	CT
D2	TT	D27	TT	D52	CT	K2	CT	K27	CT	K52	CT
D3	CT	D28	CT	D53	CT	K3	CC	K28	CC	K53	CC
D4	CT	D29	CT	D54	CT	K4	TT	K29	TT	K54	CC
D5	TT	D30	CT	D55	CT	K5	CT	K30	CT	K55	CT
D6	CT	D31	TT	D56	CT	K6	CC	K31	CC	K56	CC
D7	TT	D32	CT	D57	CT	K7	CC	K32	CT	K57	CT
D8	CT	D33	CT	D58	CT	K8	CT	K33	CC	K58	CC
D9	CT	D34	CT	D59	CC	K9	CT	K34	CC	K59	CC
D10	CC	D35	CT	D60	CT	K10	CC	K35	TT	K60	CT
D11	CT	D36	CT	D61	CT	K11	CC	K36	CC	K61	TT
D12	CT	D37	CT	D62	CC	K12	CC	K37	TT	K62	CC
D13	CT	D38	CT	D63	CT	K13	CC	K38	CC	K63	CT
D14	CT	D39	CT	D64	CC	K14	TT	K39	CC	K64	TT
D15	CT	D40	CT	D65	CT	K15	CT	K40	CC	K65	CT
D16	CT	D41	CT	D66	CC	K16	CT	K41	CT	K66	CC
D17	TT	D42	CT	D67	CC	K17	CC	K42	CC		
D18	CT	D43	CT			K18	TT	K43	TT		
D19	CT	D44	TT			K19	CT	K44	CC		
D20	CT	D45	CT			K20	CT	K45	CT		
D21	TT	D46	CT			K21	TT	K46	TT		
D22	TT	D47	CT			K22	CT	K47	CT		
D23	TT	D48	CT			K23	CC	K48	CT		
D24	CT	D49	CT			K24	CT	K49	CC		
D25	CT	D50	CT			K25	CT	K50	CC		

MTHFR geni 677 C>T polimorfizminin genotip dağılımları ve allel frekansları Ki kare (χ^2) testi kullanılarak analiz edilmiştir (Çizelge 14, 15). Hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımları ve allel frekansları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0.05$). Hasta ve kontrol grupları arasında CC ve CT+TT genotiplerine göre karşılaştırma yapıldığında istatistiki olarak önemli bir fark saptanmıştır ($p<0.05$). Hasta ve kontrol grupları arasında TT genotiplerine ait oransal değerlendirme yapıldığında, hasta grubundaki genotip frekansı oranının kontrol grubu ile benzer olduğu görülmektedir. Diğer taraftan 677CT genotip frekansı oranı hasta grubunda daha yüksektir ve bu fark istatistiki olarak önemlidir ($p<0.05$). Kontrol grubunda yüksek olan 677CC genotip frekansı oranı, hasta ve kontrol grupları arasında istatistiki olarak önemli ($p<0.05$) bir oransal farka sebep olmaktadır. Benzer şekilde allel frekanslarının genel karşılaştırmasında hasta ve kontrol grupları arasında önemli bir fark bulunmuştur. “T” allel frekansı oranı hasta grubunda(%53.7) kontrol grubuna(%37.1) göre daha yüksektir ve oranlar arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). “C” allel frekansı oranı kontrol grubunda (%62.9) hasta grubuna (%46.3) göre daha yüksek bulunmuştur ve iki gruptaki bu oransal fark istatistiki olarak önemlidir ($p<0.05$).

Çizelge 14. MTHFR geni 677 bölgesi için down sendromlu çocuk sahibi annelerden oluşan hasta ve sağlıklı çocuk sahibi annelerden oluşan kontrol gruplarına ait genotip frekansları (n: birey sayısı)

	Genotip Frekansları			
	CC	TT	CT	CT+TT
	n	n	n	n
	%	%	%	%
Down sendromlu çocuk sahibi anneler (n:67)	6	11	50	61
	9	16.4	74.6	91.04
Sağlıklı çocuk sahibi anneler (n:66)	28	11	27	38
	42.4	16.7	40.9	57.6
χ^2 Testi	21.009			19.572
OR(%95CI) Odd Değeri (%95 Güven Aralığı)	1	0.214 (0.064-0.722)	0.116(0.043-0.314)	

Çizelge 15. MTHFR geni 677 bölgesi için down sendromlu çocuk sahibi annelerden oluşan hasta ve sağlıklı çocuk sahibi annelerden oluşan kontrol gruplarına ait allel frekansları (n: birey sayısı)

	Allel Frekansları	
	C	T
	n	n
	%	%
Down sendromlu çocuk sahibi anneler (n:67)	62 46.3	72 53.7
Sağlıklı çocuk sahibi anneler (n:66)	83 62.9	49 37.1
χ^2 Testi	7.399	
OR(%95CI) Odd Değeri (%95 Güven Aralığı)	1	0.508 (0.31-0.83)

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda yer alan MTHFR geni A1298C ve C677T polimorfizmleri ile ilgili literatürde, MTHFR geni C677T polimorfizmini down sendromlu çocuk sahibi olma ile ilişkilendiren bazı çalışmalar bulunmaktadır. James ve ark. (89) 16 farklı bölge ve Kanada popülasyonu ile yaptığı çalışmada, sağlıklı çocuk sahibi olan 50 anne ve down sendromlu çocuk sahibi olan 57 annede 677 C>T polimorfizmi incelenmiştir. Bu çalışmaya göre MTHFR geni 677 pozisyonunda CT heterozigot ve TT homozigot genotiplerinin frekansı, down sendromlu çocuk sahibi olan annelerde önemli oranda daha yüksek çıkmıştır. OR/%95Cl değerlerine göre, down sendromlu çocuk sahibi annelerde, sağlıklı çocuk sahibi annelere göre CT genotipi 2.5 kat, TT genotipi 3.2 kat daha yüksek çıkmıştır. Çalışmamızda da James ve ark. (89) yaptığı çalışma ile uyumlu olarak CT+TT genotip dağılımları bakımından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0.05$). Nöral tüp defekti (NTD) taşıyan çocuk sahibi annelerde çalışılan MTHFR mutasyonu ile ilgili yapılan çalışmaları toparlayan meta analiz (90) sonuçlarına göre homozigot TT geneotipi yüzdesi %14.5 iken, etkilenmeyen kontrol grubunda bu oran %8.5 olarak tesbit edilmiştir. NTD için genetik bir risk faktörü olan MTHFR 677 C>T polimorfizmi için yapılan çalışmalarda ortaya çıkan veriler, James ve ark. (89) down sendromlu çocuk sahibi anneler ile yaptığı çalışma ile uyumlu olarak TT genotipi ile ilgili veriler ile benzerdir (%14,%8,sırasıyla hasta, kontrol). Aynı zamanda bizim yaptığımız çalışmada T alleli frekansının, down sendromlu çocuğu olan grupta kontrol grubuna göre bir hayli yüksek olması bakımından da çalışmamız ile de uyumludur. Bizim çalışmamız ile de benzer olarak heterozigot CT genotipinin Down sendromlu çocuk sahibi annelerde TT genotipine göre daha yüksek çıkması, yapılan bir çalışmada, TT genotipi taşıyan annelerin canlı down sendromlu bebek dünyaya getirme ihtimalinin düşük olması ve down sendromu meydana gelmesinde ki genetik çeşitlilikten kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Çünkü çalışmaya kürete edilen veya düşük yapılan down sendromlu fetüse sahip anneler ve translokasyon tipi, mozaik ya da diğer sebeplerle down sendromu meydana gelmiş bebeğe sahip olan anneler dahil edilmemiştir. Ancak bu durumun tam tersine mayotik ayrılamama meydana gelen vakaların %95'nin gebelik öncesi oluştuğu ve maternal durumun etkili olduğu belirlenmiştir. Annenin genotipi ve maruz kaldığı çevre down

sendromlu çocuk meydana getirmesinde temel etkindir. Bu yüzden normal folat metabolizması sadece gebelik sonrası dönemde değil, gebelik öncesi dönemde de (normal kromozom segregasyonu için) büyük önem taşır (91).

Brandalize ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada maternal MTHFR geni ve C677T ve A1298C polimorfizmleri ve down sendromlu ve konjenital kalp defekti olan çocuk sahibi olma arasındaki ilişki 239 down sendromlu çocuk sahibi anne ve 197 normal çocuk sahibi annede araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, genotip dağılımları down sendromlu çocuğu olan annelerde benzer dağılım gösterirken, 677CT ya da 677TT ve 1298AA genotip kombinasyonu taşıyan down sendromlu çocuk sahibi annelerde düşük riskinin daha yüksek olduğu tesbit edilmiştir. Çalışmamız ile uyumlu olarak C677T polimorfizmi ve Down sendromlu çocuk sahibi olma, istatistiksel olarak ilişkili bulunmuştur ($p=0.05$). Maternal 677T alleli taşıma ise down sendromlu çocuklarda konjenital kalp defekti meydana gelme riskini arttırmaktadır (92)

Muthuswamy ve ark. (23), Hindistan popülasyonu ile yaptıkları, maternal C677T ve A1298C polimorfizmleri ve Down sendromlu çocuk sahibi olma arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaları bir araya getiren metaanaliz sonuçlarına göre, C677T polimorfizmi taşıyan annelerde risk 2.48 artmış olup, çalışmamız ile uyumlu olarak istatistiksel olarak da önemlidir. A1298C polimorfizmi taşıyan annelerde ise sırası ile dominant ve resesif modelde risk artışı 1.60 ve 2.12 olarak bulunmuştur ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir ve bu sonuç çalışmamız ile uyumludur.

Boduroğlu ve ark. (93) tarafından yapılmış bir çalışmada MTHFR A1298C ve C677T polimorfizmlerinin down sendromlu çocuk sahibi olma durumu ile ilişkili olmadığı belirlenmiştir. C677T ve A1298C polimorfizmleri homozigot ve heterozigot genotipler arasında da istatistiksel olarak herhangi bir fark bulunmadığı belirtilmiştir. MTHFR A1298C polimorfizmi için belirtilmiş olan bu sonuçlar çalışmamızda tespit edilen sonuçlarla benzer olmakla beraber C677T polimorfizmi için aynı durum söz konusu değildir.

Meta-analiz çalışmaları Down sendromlu çocuk sahibi olma durumu ile MTHFR geninde meydana gelen polimorfizmlerin ilişkileri hakkında farklı sonuçlar içerebilmektedir. Wu ve ark. (94) tarafından yapılmış olan bir meta-analiz çalışmasında 2806 down sendromlu çocuğu olan anne ve 4597sağlıklı çocuğu olan annelerde maternal MTHFR genindeki bu iki yaygın polimorfizmin etkisini araştırmışlardır.

MTHFR C677T varyant genotipi (TT+CT) DS riski ile ilişkili olarak tespit edilmiştir. Özellikle 677T alleli taşıyıcılarının DS için yüksek riske sahip olduğu belirtilmiştir. MTHFR A1298C polimorfizmi için 1854/2364 (DS' lu çocuğu olan anne sayısı/sağlıklı çocuğu olan anne sayısı) bireyde yaptıkları analizde bu polimorfizmin DS için risk oluşturmadığını göstermişlerdir.

MTHFR C677T ve/veya A1298C polimorfizmlerinin belirlendiği bireylerde ilgili polimorfizm sıklıkları incelendiği bir araştırmada (95), çalışmaya dahil edilmiş olan 164 bireyden 109' unda (%66.5) C677T, 95' inde (%57.9) A1298C polimorfizmi gözlenmiştir. Her iki polimorfizm sıklıkları açısından herhangi bir farklılık saptanmamıştır. Türk popülasyonunda yapılan benzer çalışmalarda C677T polimorfizmi frekansı yaklaşık olarak %50-65, MTHFR A1298C polimorfizmi frekansı ise %50-58 oranları arasında değişiklik göstermektedir. Çalışmamız da ise 133 bireyden 99' unda (%74.4) MTHFR C677T, 129 bireyden 65'inde (%50) A1298C polimorfizmi gözlenmiştir. Çalışmamızda C677T polimorfizmi frekansı diğer çalışmalardan daha yüksek olmasına rağmen A1298C polimorfizmi frekansı benzerlik göstermektedir.

Suudi Arabistan'da yapılmış olan benzer bir çalışmada (96), down sendromlu çocuğa sahip 30 anne ve sağlıklı çocuğa sahip 40 annede MTHFR C677T polimorfizmi incelenmiştir. Bu iki grupta ilgili genotip frekansları bakımından istatistiki olarak önemli bir farklılık gözlenmezken T allelinin DS için maternal riski arttırdığı belirtilmiştir. Bu allelin varlığı MTHFR aktivitesini ve DNA hipometilasyonunu azaltmaktadır. DNA hipometilasyonu kromozomal değişimlerle ilişkilidir. Diğer taraftan 677T' nin maternal kromozom ayrılamaması üzerine varsayılan etkisi oositte değiştirilmiş DNA metilasyon kalıpları ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızda da benzer şekilde 677T alleli oranı down sendromlu çocuk sahibi olan annelerde yaklaşık olarak %54 bulunmuştur ve bu oran kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak önemlidir.

Benzer şekilde MTHFR polimorfizmleri ve DS' lu bebek sahibi olma durumu arasındaki ilişki gözönünde bulundurularak yapılmış olan farklı bir çalışmada, DS' lu çocuğu olan 40, sağlıklı çocuğu olan 44 annenin peripherall lenfositlerinden elde edilen DNA' da MTHFR promotor metilasyonu araştırılmıştır. İlk grupta MTHFR promotor metilasyonunun önemli bir artış gösterdiği belirlenmiştir. MTHFR promotor metilasyonu seviyeleri ile ilişkili olarak lenfositlerde mikronükleus sıklığında

gözlenmiştir. MTHFR epimutasyonlarının genomik dengesizliği arttırdığı ve bu durumun DS' lu çocuk sahib olma riskinde rol oynayabileceği bildirilmiştir (97).

Çalışmamızda Down sendromlu çocuk sahibi olan anneler ile kontrol grubu anneler arasında homosistein değerleri bakımından istatistiki olarak önemli bir fark bulunmuştur ve birinci grupta homosistein değerleri ortalaması 13.46 (nmol/mL) iken kontrol grubunda 18.14 (nmol/mL) olarak belirlenmiştir. Kohli ve ark. (98) tarafından yapılmış olan benzer bir çalışmada ise birinci grubun homosistein değerleri ortalaması 12.26 (µmol/L) iken ikinci grubun (kontrol grubu) 17.33 (µmol/L) olarak belirlenmiştir ve iki grup arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Benzer sonuçlar elde edilmiş olmasına rağmen literatürle bir uyum gözlenmemiştir (20,99). Bir çok çalışmada kontrol grubunda homosistein değerlerinin ortalaması down sendromlu çocuğu olan annelere ait gruptan daha düşük bulunmuştur. Bunun sebepleri arasında etilkobalamin eksikliği ve diğer genetik faktörler belirtilebilir (98). Çalışmamızda MTHFR C677T polimorfizmi DS' lu çocuk sahibi olma riski ile ilişkili bulunmuştur. Genotipler gözönüne alındığında down sendromlu çocuğu olan ve 677TT genotipine sahip annelerin serum homosistein değerlerinin ortalaması (20.25 nmol/mL), kontrol grubundaki annelerin homosistein değerlerinin ortalamasından (15.53 nmol/mL) daha yüksek olduğu görülmektedir. 677CT bireylerde ise serum homosistein düzeylerine ait ortalamalar kontrol grubunda hasta grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. 677TT genotipli bireylerin serum homosistein seviyeleri literature ile uyumludur. Folik asit değerleri açısından hem genel değerlendirme hem de her iki polimorfizme ait genotiplerin değerlendirilmesinde literatürle uyumlu sonuçlar görülmektedir. Yani Down sendromlu çocuğu olan annelere ait folat değerleri, sağlıklı çocuğu olan annelere ait folat değerlerinden daha düşük bulunmuştur ve 1298AC genotipi hariç tüm genotiplerde ve genel değerlendirmede hasta ve kontrol grubu arasındaki farklılık önemli olarak tespit edilmiştir.

İzci ve ark. (100), folat metabolizmasında görevli maternal gen polimorfizmleri ile down sendromlu çocuğa sahip olma riski arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. MTHFR 677C allel frekansı Down sendromlu çocuğu olan annelerde önemli oranda yüksek bulunmuştur. Azaltılmış folat taşıyıcısı 1 geninde A80G polimorfizmi ile down sendromlu çocuk sahibi olma durumu arasında herhangi bir ilişki tespit edilememiştir. Bizim çalışmamızla benzer sonuçlar sözkonusu değildir. Ancak Down sendromlu çocuk

sahibi olma durumu ile folat metabolizmasında görevli genlerin polimorfizmlerinin birlikte incelenmesi gerektiği, gen-beslenme, gen-gen etkileşimi ve etnik kökenin gözönünde bulundurulması gereken önemli değişkenler olduğunu vurgulamışlardır.

Hücre bölünmesinde normal kromozom sayısından sapmalar anöploidiye sebep olabilir. İnsanlarda anöploidi, etkilenen hücre tipine bağlı olarak farklı klinik etkilere sahiptir. Anöploidinin ve kromozom dengesizliğinin nedenleri tam olarak bilinmemektedir. İnsan genomu DNA' nın büyük bir kısmını oluşturan, protein kodlama yeteneği olmayan tekrarlı kısa DNA dizileri içermektedir. Bunlar kromozomların normal fonksiyonlarında belirli görevler üstlenebilirler. Gen ekspresyonu ve kromozom biyolojisi kromozomlarda bulunan epigenetik mekanizmalardan etkilenmektedir. Epigenetik bilgi heterokromatin oluşumunda temeldir. Heterokromatinin yapısı post-translasyonel histon modifikasyonu ve DNA metilasyonuna bağlıdır. Heterokromatin yapısındaki DNA tekrarları önemsiz olarak değerlendirilse de son çalışmalarda heterokromatinin kromozom dağılımı boyunca önemli bir role sahip olabileceği belirtilmiştir. DNA metilasyonu, sitozin halkasının 5. karbonuna S-adenosilmetiyonin (SAM) metil grubunun kovalent bağlanmasıdır. DNA metilasyonu, histondeasetilazlar gibi enzimatik bileşenler ve metillenmiş DNA' ya bağlı spesifik proteinler aracılığıyla tamamlanır ve histonların post-trasnlasyonel modifikasyonlarıyla yönlendirilmektedir (101). Bizim çalışmamızda MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfizmleri ile birlikte genomik DNA metilasyonunun down sendromlu bebek sahibi olma durumu arasındaki ilişki incelenmemiştir. Yapılacak diğer çalışmalarda ilgili polimorfizmlerin DNA metilasyon değerleri gözönünde bulundurularak değerlendirilmesi MTHFR gen polimorfizmleri ile down sendromlu çocuk sahibi olma durumu arasındaki ilişkinin altında yatan mekanizmaların ortaya çıkarılmasında etkili olabilecektir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada Down sendromu tanısı almış çocukların annelerinden ve herhangi bir hastalık tanısı almamış normal çocuk sahibi annelerden oluşturuldu. 67 Down sendromlu çocuğu olan anne ve 66 sağlıklı çocuğu olan anne, MTHFR Geni A1298C ve C677T polimorfizmleri açısından moleküler genetik yöntemlerle değerlendirildi ve genotip dağılımları belirlendi. Elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

1. Hasta ve kontrol grubuna ait homosistein ve folat değerleri bakımından istatistiksel olarak farklılık olduğu saptanmıştır ($p<0.05$).
2. MTHFR geni 1298 polimorfizminde genotip frekansları ve allel frekansları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$).
3. Hasta ve kontrol grubu arasında MTHFR 1298CC homozigot genotipi frekansı oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur. 1298CC genotipi oranının hasta grupta (% 26.2) kontrol grubuna (%10.9) kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum CC genotipinin down sendromlu çocuk dünyaya getirme ile ilişkili olabileceğini düşündürebilir fakat çalışılan sayının artırılması gerekir.
4. MTHFR 1298C alleli oranının hasta grupta (%40.8) kontrol grubuna (%29.7) kıyasla daha yüksek bulunması, C allelinin hastalığa yakalanma riskiyle yakından ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Ancak örneklem sayısının artırılması gerekir.
5. MTHFR A1298C polimorfizmi açısından dominant modelde AC+CC genotip frekansı hasta grupta %55.3 iken, kontrol grubunda %48.4 olarak bulunmuştur. Bu modelde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanamamıştır ($p>0.05$).
6. MTHFR geni C677T polimorfizminde genotip ve allel frekansları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($P<0.05$).
7. MTHFR C677T polimorfizmi açısından, CT ve TT genotipleri oranı, CC genotipine oranla, down sendromlu çocuk sahibi annelerde, kontrol grubu annelere göre daha yüksek çıkmıştır. Bu bölge açısından bir ya da her iki allelini polimorfik taşıyan annelerin down sendromlu çocuk sahibi olma riskinin daha yüksek olduğu söylenebilir ancak hasta sayısı artırılmalıdır.

8. MTHFR C677T polimorfizmi açısından CT+TT genotip dağılımı hasta grubunda %91.04 iken, kontrol grubunda %57.6 olarak bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubu arasında dominant modelde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($P<0.05$).
9. Down sendromlu çocuk sahibi olma riskinin belirlenmesinde, MTHFR gen polimorfizmlerinin ve folat metabolizmasında etkili olan diğer genlerin polimorfizmlerinin birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir.
10. DNA metilasyon düzeyleri ile MTHFR A1298C ve C677T polimorfizmlerinin birlikte değerlendirilmesi down sendromlu çocuk sahibi olma durumu hakkında daha açıklayıcı sonuçlara ulaşabilmemizi sağlayabilir.

MTHFR geni 1298 ve 677 polimorfizmlerinin down sendromlu çocuk sahibi olma ile ilişkisi üzerine yapılan çalışmalarda genotip ve allel frekansları arasında popülasyonlara özgü farklılıklar elde edilmiştir. Farklılıkların yanı sıra farklı popülasyonlara ait birbirini destekleyen benzer bulgular da elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda da diğer çalışmalarla uyumlu ve farklı sonuçlar bulunmuştur. Bu polimorfizmler ile down sendromlu çocuk sahibi olma arasındaki ilişki hakkında kesin bir yargıya varmak için örneklem sayısının daha geniş bir aralıkta olması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Kasap H, Kasap M, Demirhan O, Alptekin D, Lüleyap Ü, Pazarbaşı A ve Güzel Aİ.** Tıbbi Biyoloji ve Genetik. 2. Baskı, Adana: Özyurt Matbaacılık, 2010.
2. **Lamb NE, Feingold E, Savage A, Avramopoulos D, Freeman S, Gu Y, Halberg A, Hersey J, Karadima G, Pettay D, Saker D, Shen J, Taft L, Mikkelsen M, Petersen MB, Hassold T, Sherman SL.** Characterization of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal nondisjunction of chromosome 21. *Hum. Mol.Genet*, 1997; 6: 1391–1399.
3. **Oliver TR, Feingold E, Yu K, Cheung V, Tinker S, Yadav-Shah M, Masse N, Sherman SL.** New insights into human nondisjunction of chromosome 21 in oocytes. *PLoS Genet*, 2008; 4:e1000033.
4. **Warren AC, Chakravarti A, Wong C, Slaugenhaupt SA, Halloran SL, Watkins PC, Metaxotou C, Antonarakis SE.** Evidence for reduced recombination on the nondisjoined chromosomes 21 in Down syndrome. *Science*, 1987; 237: 4-652.
5. **Oliver TR, Tinker SW, Allen EG, Hollis N, Locke AE, Bean LJH, Chowdhury R, Begum F, Marazita M, Cheung V.** Altered patterns of multiple recombinant events are associated with nondisjunction of chromosome 21. *Hum. Genet*, 2012; 131: 1039–1046.
6. **Oliver TR, Middlebrooks CD, Tinker SW, Allen EG, Bean L JH, Begum F, Feingold E, Chowdhury R, Cheung V, Sherman SL.** An examination of the relationship between hotspots and recombination associated with chromosome 21 nondisjunction. *PLoS ONE*, 2014; 9:e99560.
7. **Coppedè F.** The genetics of folate metabolism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome and associated congenital heart defects. *Review*, 2015; 6:223.
8. **Kuliev A, Zlatopolsky Z, Kirillova I, Spivakova J and CieslakJanzen J.** Meiosis errors in over 20,000 oocytes studied in the practice of preimplantation aneuploidy testing. *Reprod. Biomed.Online*, 2011; 22: 2–8.
9. **Penrose LS.** The relative effect of paternal and maternal age in Mongolism. *J Genet*, 1933; 27:219-224.
10. **Penrose LS.** The relative etiological importance of birth order and maternal age in Mongolism. *Proc R Soc B Biol Sci*, 1934;115: 431-450.
11. **Antonarakis SE, Petersen MB, McInnis MG, Adelsberger PA, Schinzel AA, Binkert F, Pangalos C, Raoul O, Slaugenhaupt SA, Hafez M, Cohen M M, Roulson D, Schwartz S, Mikkelsen M, Tranebjaerg L, Greenberg F, Hoar DI, Rudd NL, Warren AC, Metaxotou C, Bartsocas C, Chakravarti A.** The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 1992; 50:544-550
12. **Ballesta F, Queralt R, Gomez D, Solsona E, Guitart M, Ezquerro M, Moreno J, Oliva R.** Parental origin and meiotic stage of non-disjunction in 139 cases of trisomy 21. *Ann Genet*, 1999; 42:11-15.
13. **Muller F, Rebiffe M, Taillandier A, Oury JF, Mornet E.** Parental origin of extra chromosome in prenatally diagnosed fetal trisomy 21. *Hum Gent*, 2000; 106: 340-344
14. **Sherman SL, Freeman SB, Allen EG, Lamb NE.** Risk factors for nondisjunction of trisomy 21. *Cytogenet Genome Res*, 2005; 111: 273-280.
15. **Allen EG, Freeman SB, Druschel C, Hobbs CA, O'Leary LA, Romitti PA, Royle MH, Torfs CP, Sherman SL.** Maternal age and risk for trisomy 21 assessed by the origin of chromosome nondisjunction: a report from the Atlanta and National Down Syndrome Projects. *Hum Genet* 2009; 125: 41-52.

16. **Mentch SJ, Locasale J W.** One-carbon metabolism and epigenetics: understanding the specificity. *Ann N.Y. Acad. Sci*, **2015**;1-8.
17. **Locasale,J.W.** Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat. Rev. Cancer*, **2013**; 13:572-583.
18. **Baydar T, Şahin G.** Folat düzeylerini etkileyen faktörler. *T Klin Tıp Bilimleri*, **1994**;14:48-61.
19. **Patterson D.** Folate metabolism and the risk of down syndrome. *Genetics*, **2008**; 12:93-97.
20. **James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, Yi P, Tafoya DL, Swenson DH, Wilson VL, Gaylor DW.** Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *American Journal of Clinical Nutrition*, **1999**;70:495-501.
21. **Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N.** Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *American Journal of Human Genetics*, **1991**;48(3):536-545.
22. **Goyette P, Rozen R.** The thermolabile variant 677C→T can further reduce activity when expressed in cis with severe mutations for human methylenetetrahydrofolate reductase. *Human Mutation*, **2000**;16(2):132-138.
23. **Muthuswamy S, Agarwal S.** Do the MTHFR gene polymorphism and Down syndrome pregnancy association stands true? A case–control study of Indian population and meta-analysis. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, **2015** (In Press)
24. **Shaffer L, Slowak ML, Campbell LJ.** ISCN: An international system for human cytogenetic nomenclature. **2009**, S. Karger, Basel
25. **Wyandt HE, Tonk VS.** Atlas of human chromosome heteromorphisms. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/NL,**2004**
26. **Kalz L, Kalz-Füller B, Hegde S, Schwanitz G.** (2005) Polymorphisms of Q-band heterochromatin: qualitative and quantitative analyses of features in 3 ethnic groups (Europeans, Indians and Turks). *Int J Hum Genet*, **2005**; 5: 153-163
27. **Waye JS, Willard HF.** Human beta satellite DNA: genomic organization and sequence definition of a class of highly repetitive tandem DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1989** ; Vol.86: pp. 6250-6254.
28. **Mitchell A, Jeppesen P, Hanratty D, Gosden J.** The organisation of repetitive DNA sequences on human chromosomes with respect to the kinetochore analysed using Genetics of Down Syndrome 21 a combination of oligonucleotide primers and CREST anticontromere serum. *Chromosoma*, **1992**;101: 333-341.
29. **Tagarro I, Fernández-Peralta AM, González-Aguilera JJ.** Chromosomal localisation of human satellites 2 and 3 by a FISH method using oligonucleotides as probes. *Hum Genet*, **1994**;93: 383-388.
30. **Day S.** Genetics and Etiology of Down Syndrome. 3thed. Intech, **2011**.
31. **Gardner RJM.** Sutherland GR.Chromosome abnormalities and genetic counselling. Oxford University Press (3rd ed.),**2004**.
32. **Weinhausel A, Plessl T, Senger G, Pulverer W, Wielscher M, Pichler R, Kriegner A, Gencik M, Noehammer C.** DNA methylation alterations in trisomy 21. *Medgen*, **2011**; 23:199.

33. **Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS, Toyoda A, Ishii K, Totoki Y, Choi DK, Groner Y, Soeda E, Ohki M, Takagi T, Sakaki Y, Taudien S, Blechschmidt K, Polley A, Menzel U, Delabar J, Kumpf K, Lehmann R, Patterson D, Reichwald K, Rump A, Schillhabel M, Schudy A, Zimmermann W, Rosenthal A, Kudoh J, Schibuya K, Kawasaki K, Asakawa S, Shintani A, Sasaki T, Nagamine K, Mitsuyama S, Antonarakis SE, Minoshima S, Shimizu N, NordSiek G, Hornischer K, Brant P, Scharfe M, Schon O, Desario A, Reichelt J, Kauer G, Blocker H, Ramser J, Beck A, Klages S, Hennig S, Riesselmann L, Dagand E, Haaf T, Wehrmeyer S, Borzym K, Gardiner K, Nizetic D, Francis F, Lehrach H, Reinhardt R, Yaspo ML.** The DNA sequence of chromosome 21. *Nature*, **2000**;405: 311-319.
34. **Lejeune J, Gauthier M, Turpin R.** Les chromosomes humains en culture de tissues. *C R Acad Sci Paris*, **1959**; 248: 602-603.
35. **Antonarakis SE.** Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. Down Syndrome Collaborative Group. *N Engl J Med*, **1991**; 324: 872-876.
36. **Freeman SB, Allen EG, Oxford-Wright CL, Tinker SW, Druschel C, Hobbs CA, O'Leary LA, Romitti PA, Royle MH, Torfs CP, Sherman SL.** The National Down Syndrome Project: design and implementation. *Public Health Rep*, **2007**; 122:62-72.
37. **Antonarakis SE, Petersen MB, McInnis MG, Adelsberger PA, Schinzel AA, Binkert F, Pangalos C, Raoul O, Slaugenhaupt SA, Hafez M,** The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet* **1992**;50:544-550.
38. **Yoon PW, Freeman SB, Sherman SL, Taft LF, Gu Y, Pettay D, Flanders WD, Khoury MJ, Hassold TJ.** Advanced maternal age and the risk of Down syndrome characterized by the meiotic stage of chromosomal error: a population-based study. *Am J Hum Genet*, **1996**; 58: 628-633
39. **Warren AC, Chakravarti A, Wong C, Slaugenhaupt SA, Halloran SL, Watkins PC, Metaxotou C, Antonarakis SE.** Evidence for reduced recombination on the nondisjoined chromosomes 21 in Down syndrome. *Science*, **1987**;237: 652-654.
40. **Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ, Pogribna M, Rozen R, James SJ.** Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism as Maternal Risk Factors for Down Syndrome. *Am. J. Hum. Genet*, **2000**;67:623-630.
41. **Pharmacology.** St.Louis: CV Mosby Company, **1988**:612-3.
42. **Günaydın M F.** Demans Hastalarında Homosistein,Vitamin B12 ve Folat İlişkisi. Tıpta Uzmanlık tezi, S.B. İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, **2008**.
43. **Ratanasthien K, Blair JA, Leeming RJ, Cooke WT, Melikian V.** Serum folates in man. *J Clin Path*, **1977**; 30:438-448.
44. **Stokstad ELR, Koch J.** Folic acid metabolism. *Physiol Rev*, **1967**; 47:82-116.
45. **Butterworth CE, Santini R, Frohmeyer WB.** The pteroylglutamate components of American diets as determined by chromatographic fractionation. *J Clin Invest*, **1963**; 42:1929-1939.
46. **Donaldson KO, Keresztesy JC.** Naturally occurring forms of folic acid. iii. Characterisation and properties of 5-methyldihydrofolate, an oxidation product of 5-methyltetrahydrofolic acid. *J Biol Chem*, **1962**; 237:3815-3819.
47. **Lucock MD, Priestnall M, Daskalakis I, Schorah CJ, Wild J, Levene MI.** Nonenzymatic degradation and salvage of dietary folate: Physicochemical factors likely to influence bioavailability. *Biochem Mol Med*, **1995**; 55:43-53.

48. **Stemmermann G, Heffelfinger SC, Noffsinger A, et al:** The molecular biology of esophageal and gastric cancer and their precursors: oncogenes, tumor suppressor genes and growth factors. *Hum Pathol*, **1994**; 25:968-81.
49. **Herbert V, Larrabee AR, Buchanan JM.** Studies on the identification of a folate compound of human serum. *J Clin Invest*, **1962**; 41:1134–1138.
50. **Lucock MD, Hartley R, Smithells RW.** A rapid and specific HPLC-electrochemical method for the determination of endogenous 5-Methyltetrahydrofolic acid in plasma using solid phase sample preparation with internal standardization. *Biomed Chromatogr*, **1989**; 3:58–64.
51. **Cook JD, Cichowitz DJ, George S, Lawler A, Shane B.** Mammalian folyl-g-glutamate synthetase, 4. In vitro and in vivo metabolism of folates and analogues and regulation of folate homeostasis. *Biochemistry*, **1987**; 26:530–539.
52. **Lucock M.** Folic Acid: Nutritional Biochemistry, Molecular Biology, and Role in Disease Processes. *Molecular Genetics and Metabolism*, **2000**; 71:121-138.
53. **Steinberg SE.** Mechanisms of folate homeostasis. *Am J Physiol*, **1984**; 246:319–324.
54. **Lucock M, Daskalakis I, Briggs D, Yates Z, Levene M.** Altered folate metabolism and disposition in mothers affected by a spina bifida pregnancy : Influence of 677c 3 t methylenetetrahydrofolate reductase and 2756a 3 g methionine synthase genotypes. *Mol Genet Metabol*, **2000**; 70:27–44.
55. **Ratnam M, Freisheim JH.** Proteins involved in the transport of folates and antifolates by normal and neoplastic cells. In Contemporary Issues in Clinical Nutrition. Vol 13. Folic Acid Metabolism in Health and Disease (Picciano MF, Stokstad ELR, Gregory JF, Eds.). New York: Wiley-Liss, **1990**:91–120.
56. **Horne DW, Briggs WT, Wagner C.** Transport of 5-methyltetrahydrofolic acid and folic acid in freshly prepared hepatocytes. *J Biol Chem*, **1978**; 253:3529–3535.
57. **Horne DW, Reed KA, Said HM.** Transport of 5-methyltetrahydrofolic acid in basolateral membrane vesicles from human liver. *Am J Physiol*, **1992**; 262:G150–G158.
58. **Horne DW, Reed KA, Hoefs J, Said HM.** 5-methyltetrahydrofolic acid transport in basolateral membrane vesicles from human liver. *Am J Clin Nutr*, **1993**; 58:80–84.
59. **Banerjee RV, Matthews RG.** Cobalamin-dependent methionine synthase, *FASEB J*, **1990**; 4:1450–1459.
60. **Matthews RG, Baugh CM.** Interactions of pig liver methylenetetrahydrofolate reductase with methylenetetrahydropteroylpolyglutamate substrates and with dihydropteroylpolyglutamate inhibitors. *Biochemistry*, **1980**; 19:2040–2045.
61. **Green JM, Mackenzie RE, Matthews RG.** Substrate flux through methylenetetrahydrofolate dehydrogenase: Predicted effects of the concentration of methylenetetrahydrofolate on its partitioning into pathways leading to nucleotide biosynthesis or methionine regeneration. *Biochemistry*, **1988**; 27:8014–8022.
62. **Selhub J, Miller JW.** The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr*, **1992**; 55:131–138.
63. **Green JM, Ballou JP, Matthews RG.** Examination of the FOLIC ACID 135 role of methylenetetrahydrofolate reductase in incorporation of methyltetrahydrofolate into cellular metabolism. *FASEB J*, **1988**; 2:42–47.

64. **Leclerc D, Wilson A, Dumas R, Gafuik C, Song D, Watkins D, Heng HH, Rommens JM, Scherer SW, Rosenblatt DS, Gravel RA.** Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci*, **1998**; 95:3059–3064.
65. **Finkelstein JD.** Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem*, **1990**; 1:228–237; **Finkelstein, JD.** Methionine metabolism in mammals: The biochemical basis for homocystinuria. *Metabolism*, **1974**; 23:387–398.
66. **Finkelstein JD, Kyle WE, Martin JJ, Pick AM.** Activation of cystathionine synthase by adenosylmethionine and adenosylethionine. *Biochem Biophys Res Comm*, **1975**; 66:81–87.
67. **Finkelstein JD, Martin JJ.** Methionine metabolism in mammals: Distribution of homocysteine between competing pathways. *J Biol Chem*, **1984**; 259:9508–9513.
68. **Finkelstein JD, Martin JJ.** Methionine metabolism in mammals: Adaptation to methionine excess. *J Biol Chem*, **1986**; 261:1582–1587.
69. **Kutzbach C, Stokstad ELR.** Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase: Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. *Biochim Biophys Acta*, **1971**; 250:459–477.
70. **Fidaner H.** Duygudurum Bozuklukları ve Folatlar. Duygudurum Dizisi, **2001**; 6:272-276.
71. **Jaffe JP, Schilling RF.** Erythrocyte folate levels: A clinical study. *Am J Hematol*, **1991**; 36:116-121.
72. **MRC Vitamin Study Research Group.** Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet*, **1991**; 338:131-7.
73. **Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG.** A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA*, **1995**; 274:1049-57.
74. **Christensen B, Rosenblatt D S.** Effects of folate Deficiency on Embryonic Development. *Bailliere's Clinical Haematology*, **1995**; 8:617-637.
75. **Alkan N.** Polikistik Over Sendromlu Kadınlarda Kan Crp ,Homosistein Düzeyleri, Obezite Ve İnsülin Rezistansı Arasındaki İlişkinin Araştırılması. Tıpta Uzmanlık tezi, Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, **2006**.
76. **Beetstra S, Thomas P, Salisbury C, Turner J, Fenech M.** Folic Acid Deficiency Increases Chromosomal Instability, Chromosome 21 Aneuploidy and Sensitivity to Radiation-Induced Micronüclei. *Mutation Research*, **2005**; 578:317-326.
77. **Martinez-Frias M L.** The Biochemical Structure and Function of Methylenetetrahydrofolate Reductase Provide the Rationale to Interpret the Epidemiological Results on the Risk for Infants With Down Syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, **2008**; 146A:1477–1482.
78. **Eskes T K A B.** Abnormal folate metabolism in mothers with Down syndrome offspring: Review of the literature. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **2006**; 124:130–133.
79. **Botto L D, Yang Q.** 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants and Congenital Anomalies: A HuGE Review. *Am J Epidemiol*, **2000**; 151:862-877.
80. **Esfahani S T , Cogger E A, Caudill M A.** Heterogeneity In The Prevalence Of Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms In Women Of Different Ethnic Groups. *Journal of The American Dietetic Association*, **2003**; 103:200-207.
81. **Rosenblatt D S.** Clinically Important Genes Methylenetetrahydrofolate Reductase. *Clin Invest Med*, **2001**; 24:56-59.

82. **Gaughan D J, Barbaux S, Kluijtmans L A J, Whitehead A S.** The Human And Mouse Methylenetetrahydrofolate Reductase (*MTHFR*) Genes: Genomic Organization, Mrna Structure And Linkage To The *CLCN6* Gene. *Gene*, **2000**; 257: 279–289.
83. **Pozzi E, Vergani P, Dalpra L, Combi R, Silvestri D, Crosti F, Dell’Orto M, Valsecchi M G.** Maternal Polymorphisms for Methyltetrahydrofolate Reductase and Methionine Synthetase Reductase and Risk Of Children With Down Syndrome. *Am J Obstet Gynecol*, **2009**;200:636.e1-636.e6.
84. Eriřim:
(<http://books.google.com.tr/books?id=6ZvYLuJq0WQC&pg=PA388&lpg=PA388&dq=gene+structure+of+human+and+mouse+methylenetetrahydrofolate+reductase&source=bl&ots=AJBhn64vcd&sig=slzT3IRiVVkBFuIfwfneF8iXSMg&hl=tr&sa=X&ei=cppuUcKkDIImG4gTUn4CYAg&ved=0CD8Q6AEwAjgK#v=onepage&q&f=false>) Eriřim Tarihi: 10.04.2013.
85. **Ueland P M, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset S E.** Biological and clinical implications of the *MTHFR* C677T polymorphism. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, **2001**; 22:195-201.
86. **İzmirli M, Alptekin D, Topçuoğlu M Ş, Güzel A İ.** Investigation of methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in coronary by-passed patients due to coronary atherosclerosis etiology. *Türkiye Klinikleri Cardiovascular Sciences*, **2009**; 21: 303-308.
87. **Nair R R, Khanna A, Singh R, Singh K.** Association of maternal and fetal *MTHFR* A1298C polymorphism with the risk of pregnancy loss: a study on an Indian population and a meta-analysis. *Fertility and Sterility*, **2013**; In Press.
88. **Dikmen M.** Homosistein Metabolizması ve Hastalıklarla İlişkisi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, **2004**; 24:645-652
89. **James J, Pogribna M, Pogribny I P, Melny S, Hine RJ, Gibson JB, Yi P, Tafoya DL, Swenson D, Wilson VL, Gaylor DW.** Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr*, **1999**;70:495–501.
90. **van der Put NM, Eskes TK, Blom HJ.** Is the common 677CT mutation in the Methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta-analysis. *Q J Med*, **1997**;90:111–5.
91. **van der Put NMJ, Steegers-Theunissen RPM, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Mariman EC, den Heyer M, Rozen R, Blom HJ.** Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* **1995**;346:1070–1.
92. **Brandalize AP, Bandinelli E, dos Santos PA, Roisenberg I, Schüler-Faccini L.** Evaluation of C677T and A1298C polymorphisms of the *MTHFR* gene as maternal risk factors for Down syndrome and congenital heart defects. *Am J Med GenetA*, **2009**;14:2080-7.
93. **Boduroğlu K, Alanay Y, Koldan B, Tuncbilek E.** Methylenetetrahydrofolate Reductase Enzyme Polymorphisms as Maternal Risk for Down Syndrome Among Turkish Women. *American Journal of Medical Genetics*, **2004**;127A:5-10.
94. **Wu X, Wang X, Chan Y, Jia S, Luo Y, Tang W.** Folate Metabolism Gene Polymorphisms *MTHFR* C677T and A1298C and Risk for Down Syndrome Offspring: a Meta-Analysis. *European Journal of Obstetrics&Gynecology and Reproductive Biology*, **2013**;167:154-159.
95. **Uğuz N, Erden G, Güngör O, Bal C, Yıldırımkaaya M.** *MTHFR* Geninde c677t ve/veya a1298c Polimorfizmi Tespit Edilen Bireylerde Bu polimorfizm Sıklıklarının İncelemesi. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, **2012**;3:472-476.

96. **Tayeb MT.** The Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variant (C677T) in Risk Mothers with Down Syndrome among Saudi Population. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, **2012**; 13:263-268.
97. **Coppedè F, Denaro M, Tannorella P, Migliore L.** Increased MTHFR Promoter Methylation in Mothers of Down Syndrome Individuals. *Mutation Research*, **2016**;787:1-6.
98. **Kohli U, Arora S, Kabra M, Ramakrishnan L, Gulati S, Pandey RM.** Prevalence of MTHFR C677T Polymorphism in North Indian Mothers Having Babies with Trisomy 21 Down Syndrome. *Down Syndrome Research and Practice*, **2008**;12:133-137.
99. **Sheth JG, Sheth FJ.** Gene polymorphism and folate metabolism: A maternal risk factor for Down Syndrome. *Indian Pediatrics*. **2003**;40:115-123.
100. **İzci Ay O, Ay ME, Erdal ME, Cayan F, Tekin S, Soylemez F, Sungur MA, Derici Yıldırım D.** Folate Metabolism Gene Polymorphisms and Risk for Down Syndrome Offspring in Turkish Women. *Genet. Test Mol. Biomarkers*, **2015**;19:191-7.
101. **Herrera LA, Prada D, Andonegui MA, Dueñas-González.** The Epigenetic Origin of Aneuploidy. *Current Genomics*, **2008**;9:43-50.

EKLER

ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİMYASAL VE SOLÜSYONLARIN HAZIRLANMASI

Kullanılan kimyasal ve solüsyonların hazırlanmasında kaynak olarak “Molecular Cloning”¹⁴⁰ esas alınmıştır.

Hazırlanan solüsyonlar genel olarak konsantre stoklar halindedir. Çalışma konsantrasyonlarını elde etmek için stoklardan belli oranlarda alınarak seyreltilir. Konsantrasyon dönüştürmelerinde basitçe şu formülden yararlanılabilir.

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

M1 = Hazırlanan stok konsantrasyon (M, N veya %)

V1 = Stoktan alınması gereken miktar (v)

M2 = Çalışma (son) konsantrasyonu (M, N veya %)

V2 = Hazırlanacak olan çözelti (çalışma çözeltisi) miktarı (v)

EK-1. DNA Eldesi Solüsyonları

1.1 Eritrosit Lizis Tamponu (pH=7,5) 1 Litre için;

0,32 M Sükroz Sükroz = 109,563 gr

10 mM Tris-HCl (pH=7,5) Tris-HCl = 1,211 gr

5mM MgCl₂ MgCl₂ = 1,015 gr

%1 Triton X 100 Triton X 100 = 10 gr

1 litre için gereken malzemeler belirtilen oranlarda tartılıp, son hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile çözündürülüp otoklavlandı. pH = 7,5 olarak ayarlandı. Triton X otoklavlanmadan sonra ilave edildi.

1.2. Fizyolojik Tampon (pH=7,5) 1 Litre için

0,075 M NaCl NaCl = 4,383 gr

0,025 M EDTA EDTA = 9,305 gr

1 litre için gereken malzemeler belirtilen oranlarda tartılıp, son hacim 1000 ml olacak

şekilde bidistile su ile çözündürölüp otoklavlandı. pH = 7,5 olarak ayarlandı

1.3. TE-9 (pH=9) 1 Litre için

500 mM Tris baz Tris baz = 60,5 gr

20 mM EDTA EDTA = 7,44 gr

10 mM NaCl NaCl = 0,58 gr

1 litre için gereken malzemeler belirtilen oranlarda tartılıp, son hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile çözündürölüp otoklavlandı. pH = 9 olarak ayarlandı.

1.4. %10'luk SDS

20 ml için;

2 gr SDS tartılıp, üzerine bir miktar (20 ml'den az) saf su ilave edilip iyice çözündürölü. Son hacim 20 ml olacak şekilde ayarlandı.

1.5. Proteinaz-K (10mg/ml)

100 ml için;

10 gr PK tartılır, üzerine bir miktar (100 ml'den az) saf su ilave edilip iyice çözündürölü. Son hacim 100 ml olacak şekilde ayarlandı.

1.6. 6 M NaCl

1 litre için;

321.4 gr NaCl tartılıp, üzerine bir miktar (1000 ml'den az) bidistile su ilave edilip iyice çözündürölüp son hacim 1000 ml olacak şekilde ayarlandı.

1.7. % 70 Etil Alkol

100 ml için;

70 ml etil alkol (absolut) ve 30 ml bidistile su ilave edildi.

1.8. TE tamponu (Tris/EDTA) (pH= 8)

10 mM Tris-Cl (pH=8)

0,1 mM EDTA (pH=8)

1 litre için gereken malzemeler belirtilen oranlarda tartılıp, son hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile çözündürölüp otoklavlandı. pH = 8 olarak ayarlandı.

EK-2. Elektroforez Analiz Solüsyonları

2.1. 1 X TBE (1 litre için)

100 ml 10 X TBE stok solüsyonu

900 ml bidistile su

2.2. Etidyum bromid solüsyonu (10 mg/ml)

0,1 gr etidyum bromid

10 ml bidistile su içinde çözölüp ışık almayan bir cam içinde buzdolabında muhafaza edildi.

2.3. DNA Yükleme Tamponu (Loading dye) (6X)

40 gr sükröz

0,25 gr bromfenol mavisi

100 ml olacak şekilde bidistile su içinde çözölündü. Ependorf tüplerine paylaştırılarak buzdolabında muhafaza edildi.

2.4. 10 X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Stok solüsyonu

108 gr Tris baz (890 mM)

55 gr borik asit (890 mM)

40 ml 0,5 M EDTA, pH 8.0 (20 mM)

Bir miktar bidistile su içinde çözölündükten sonra pH 8.0 olarak ayarlanıp solüsyon 1 litreye tamamlandı.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Adana’ da doğdu. İlk ve orta öğrenimini sırasıyla Mimar Sinan İlkokulu, Gazi Ortaokulu ve Sunar Nuri Çomu Lisesi’ nde, Lisans eğitimini ise 1999-2003 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’ nde tamamladı. 2006-2011 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Biyometri ve Genetik Anabilim Dalı’ nda Araştırma Görevlisi olarak görev yaptı. 2011 yılında Adana Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Hayvan Yetiştiriciliği ve Islahı Bölümü Embriyo Transfer Laboratuvarı’ nda Biyolog olarak çalışmaya başladı. 2012 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans programına başladı. Adana Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü’ nde Embriyo Transfer Laboratuar Şube Şefi olarak görevini sürdürmekte.